

DER EINFLUSS VON PROTEINKINASE-C-ISOFORMEN AUF DIE  
LOKALISATION UND FUNKTION DES ABCC2/MRP2-TRANSPORTERS IN  
EINEM MODELL DER SEPTISCHEN CHOLESTASE

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Gustav Luis Basil Buescher  
geboren am 16.02.1989 in Berlin

#### **Gutachter**

- 1. apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp**
- 2. apl. Prof. Dr. rer. nat. med. habil Ralf Claus**
- 3. Prof. Dr. med. Ralf Kubitz**

**Tag der öffentlichen Verteidigung 09. November. 2017**

## **Vorwort**

Die Arbeit wurden im Rahmen der Graduierung zum doctor medicinae (Dr. med.) am Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Fachbereich Experimentelle Anästhesie in der Zeit von Januar 2015 bis September 2016 angefertigt.

Das Center for Sepsis Control and Care (CSCC) förderte die Arbeit an der vorliegenden Dissertation mit einem Promotionsstipendium von Oktober 2015 bis März 2016.

Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie  
CSCC Vorstandssprecher  
Prof. Dr. med. Michael Bauer

Leiter des Fachbereichs Experimentelle Anästhesie  
apl. Prof. Dr. rer. nat. Ralf A. Claus

Dekan der Medizinischen Fakultät  
Prof. Dr. med. Klaus Benndorf

## Zusammenfassung

**Hintergrund** Im Verlauf der Wirtsreaktion auf eine schwere Infektion kommt es früh zu einer exkretorischen Dysfunktion der Leber. Das Auftreten der septischen Cholestase ist mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert. Die, dem Defekt der hepato- und cholangiozellulären Transportsysteme zu Grunde liegenden, pathophysiologischen Mechanismen sind noch nicht vollständig entschlüsselt und Gegenstand aktueller Forschung. Rückschlüsse über beteiligte Komponenten sind anhand der besser charakterisierten Signalkaskade der physiologischen Gallesekretion möglich und weisen der Proteinkinase-C-Familie eine entscheidende Rolle in der Regulation der Signalverarbeitung zu. Ein Grund für die anhaltend hohe Mortalität und Zunahme der Inzidenz der Sepsis ist das Fehlen von adjunktiven, immunmodulatorischen Sepsistherapeutika zur Behandlung des konsekutiven Organversagens. Die Inhibition der Proteinkinase-C wird aktuell als therapeutische Option zur kausalen Behandlung der septischen Cholestase diskutiert. Die Wiederherstellung der hepatischen Exkretionsleistung könnte das Ausmaß des Organversagens verhindern und dazu beitragen, die anhaltend hohe Mortalität der Sepsis zu senken.

**Fragestellung und Ziele** Zur Entwicklung neuer therapeutische Ansätze, die in die Signalverarbeitung von Zellen eingreifen, ist ein genaues Verständnis für die, der septischen Cholestase zugrundeliegenden Mechanismen notwendig. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, inwiefern die Proteinkinase-C die frühe inflammatorische Signalkaskade mitgestaltet, die zu einer Abnahme der Exkretionsleistung führt. Auch soll unter Kontrolle der Werte für die hepatozelluläre Integrität geklärt werden, ob die gezielte Inhibition einzelner Isoformen der Proteinkinase-C positiven Einfluss auf die Sepsis-assoziierte, exkretorische Dysfunktion ausübt.

**Methodik** In der vorliegenden Studie wurden die Experimente zur Untersuchung der Cholestase als frühe maladaptive Wirtsantwort an der humanen HepaRG-Leberzelllinie im Sepsis-Modell durchgeführt. Zusätzlich zur konventionellen Zellkultur wurde eine 3D-Zellkultur als Modell etabliert, um die komplexe, dreidimensionale Gewebearchitektur und die Polarisation des Leberparenchyms zu berücksichtigen. Das Ausmaß einer hepatozytären Schädigung wurde anhand klinisch-chemischer Verlaufsparemeter bestimmt. Als *readout* der hepatischen Funktion diente die Genexpressionsanalyse, die Immunfluoreszenzfärbung und die Bestimmung der Exkretionsleistung des kanalikulären MRP2, dem Schlüsseltransporter der Gallesekretion sowie seines Membranankers Radixin.



Um detailliertere Aussagen über die Beteiligung der Proteinkinase-C an der septischen Cholestase treffen zu können, wurde die, in ihrer Aussagekraft limitierte Genexpressionsanalyse von Kinasen um das Immunoblotting der fraktionierten Zellkompartimente (Membran und Cytosol) der HepaRG-Zellen erweitert.

**Ergebnisse und Diskussion** Im Sepsis-Modell reagierten die HepaRG-Zellen mit einer frühen, signifikanten Elevation der paraklinischen Zellintegritätsparameter und einer exkretorischen Dysfunktion auf funktioneller und molekularer Ebene. In den Hepatozyten konnte ein Polaritätsverlust nachgewiesen werden, der den gerichteten Transport von Gallensäuren und Transportern von sinusoidal nach kanalikulär hemmte und so die Cholestase aggravierte. Die Cytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  konnten als Hauptakteure im Pathomechanismus der frühen septischen Cholestase identifiziert werden. Zudem wurden den Proteinkinase-C-Isoformen  $\alpha$  und  $\zeta$  eine aktivierende Membrantranslokation im initialen septischen Geschehen nachgewiesen. Die singuläre Aktivierung des Proteinkinase-C-Signalweges mit Phorbolestern führte zur Translokation des MRP2-Transporters und seines Strukturproteins Radixin an die Membran der Hepatozyten mit einer konsekutiv nachweisbaren Cholestase und einem Anstieg der Parameter für die Zellintegrität. Die Inhibition der Proteinkinase-C hatte einen positiven Effekt auf die derangierte Signaltransduktion im septischen Geschehen. In der vorliegenden Arbeit konnte von den eingesetzten PKC-Inhibitoren Gö6850, Gö6976 und PKC412 letzterer als vielversprechender Kandidat zur kausalen Therapie der frühen septischen Cholestase identifiziert werden.

**Schlussfolgerung** Die Einschränkung der Zellintegrität, der Polaritätsverlust sowie die Abnahme der Exkretionsleistung der HepaRG-Zellen nach Stimulation mit dem Cytokinmix charakterisieren das angewendete Sepsis-Modell als praktikabel und reproduzierbar. Die Zusammenschau der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht unterschiedliche transkriptionelle und post-transkriptionelle Effekte der Proteinkinase-C auf kanalikuläre Transporter in Hepatozyten. Der erbrachte Nachweis, dass eine Proteinkinase-C-Aktivierung kausal in Zusammenhang mit dem septischen Leberversagen steht, ermöglichte den Entwurf neuer therapeutischer Konzepte und die präklinische Untersuchung im verwendeten Modell. Die PKC-Inhibition mit PKC412 zeigte signifikant positive Ergebnisse und kann als Option zur Verbesserung der frühen exkretorischen Dysfunktion in der Sepsis in weiteren Studien verfolgt werden.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Sepsis .....	1
1.2 Die Leber in der Sepsis .....	3
1.3 Hepatozellulärer Galletransport.....	5
1.4 Isoformen der Proteinkinase-C.....	10
1.5 Phosphorylierungsstatus von Radixin und MRP2-Membraninsertion.....	13
<b>2 Hypothesen und Ziele der Arbeit.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methodik .....</b>	<b>17</b>
3.1 Zellkulturbedingungen .....	17
3.1.1 HepG2 .....	17
3.1.2 HepaRG.....	17
3.1.3 HepaRG-Sphäroide .....	18
3.1.4 Stimulation .....	18
3.2 Genexpression .....	20
3.2.1 RNA-Isolation.....	20
3.2.2 Konzentrationsbestimmung .....	20
3.2.3 RNA-Integrität.....	21
3.2.4 Reverse Transkription.....	22
3.2.5 quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	23
3.2.6 Primer .....	23
3.2.7 PCR-Ansatz .....	24
3.2.8 2 Step PCR-Protokoll:.....	25
3.2.9 C <sub>T</sub> -Wert Bestimmung und Schmelzkurvenanalyse .....	25
3.2.10 Primereffizienz .....	26
3.2.11 Relative Quantifizierung .....	26
3.2.12 Erstellung eines Genexpressionsprofils .....	27
3.3 Immunoblotting.....	28
3.3.1 Zelllyse .....	28

3.3.2	Proteinkonzentrationsmessung mittels Bicinchoninsäure .....	28
3.3.3	Fraktionierung .....	29
3.3.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE) .....	29
3.3.5	Proteintransfer und Proteindetektion .....	30
3.4	Klinische Chemie .....	30
3.4.1	Bestimmung von ALAT, ASAT, LDH, $\gamma$ GT und Laktat .....	30
3.5	Immunfluoreszenz .....	31
3.5.1	Einbettung und Färbung der HepRG-Sphäroide .....	31
3.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	32
3.5.3	Vorbereitung der Sphäroide für die Immunfluoreszenz .....	32
3.5.4	Färbung von HepaRG-Zellen .....	32
3.6	Lebendzellmikroskopie .....	35
3.6.1	5-Chloromethylfluorescein-diacetat .....	35
3.7	Radixinplasmid .....	36
3.7.1	Plasmidisolierung .....	37
3.7.2	Konzentrationsbestimmung und Gelelektrophorese .....	38
3.7.3	Transfektion .....	39
3.8	Mikroskopie .....	40
3.8.1	Lichtmikroskopie .....	40
3.8.2	<i>Laser Scanning</i> Mikroskopie .....	40
3.9	Auswertung mit FIJI Software ImageJ® .....	40
3.9.1	Auswertung der Immunfluoreszenz .....	40
3.9.2	Auswertung Lebendzellmikroskopie .....	41
3.9.3	Auswertung GFP-tagged Radixin .....	41
3.10	Graphische Darstellung und statistische Auswertung .....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
4.1	Effekte von PMA auf das Strukturprotein Radixin in HepG2-Zellen .....	42
4.2	Genexpression .....	44
4.2.1	Genexpressionsprofil der PKC-Isoformen in HepaRG- und HepG2-Zellen .....	44
4.2.2	Genexpressionsanalyse nach Stimulation .....	45
4.3	Westernblot der PKC $\alpha$ und $\zeta$ in HepaRG-Zellen nach Stimulation mit PMA und Bryostatin 1 .....	58
4.4	Translokation der PKC $\alpha$ und $\zeta$ nach Stimulation-Analyse der Zellkompartimente .....	59
4.5	Effekte der Stimulation auf die Integritätsparameter der Leber .....	62

4.6	Strukturanalyse der 3D-Zellkultur - HepaRG-Sphäroide .....	66
4.6.1	MRP2 und Radixin - Zellmorphologie in HepaRG-Sphäroiden .....	68
4.7	MRP2-Immunfluoreszenz in HepaRG-Monolayer Zellkulturen .....	69
4.7.1	Effekte der Stimulation von HepaRG-Zellen auf die Lokalisation von MRP2....	71
4.8	Effekte der Stimulation auf die Exkretionsleistung des MRP2-Transporters .....	77
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>82</b>
5.1	Die HepRG-Leberzelllinie .....	82
5.1.1	HepaRG-Sphäroide .....	83
5.2	Die Zellantwort - <i>readout</i> .....	84
5.3	Der Cytokinmix als Sepsis-Modell .....	85
5.3.1	Der applizierte Cytokinmix führt zu einem Verlust der hepatozytären Integrität	86
5.3.2	Proinflammatorische Stimuli induzieren in HepaRG-Zellen eine Cholestase....	86
5.4	Polaritätsverlust der Hepatozyten in der frühen inflammatorischen Phase .....	88
5.5	Die Exkretorische Dysfunktion in der frühen Sepsis ist PKC-vermittelt .....	89
5.5.1	Homologe PKC Expressionslevel in den verwendeten Zellreihen .....	89
5.5.2	Der Sepsis-Induktion folgt eine PKC-Aktivierung.....	89
5.5.3	Der Einfluss der Cytokine auf die PKC mRNA Expression .....	91
5.6	Die aktivierte Proteinkinase-C bewirkt einen cholestatischen Phänotyp .....	92
5.6.1	Die PKC-abhängige Phosphorylierung von Zellstrukturen in Hepatozyten .....	96
5.7	Bryostatin 1 - PKC-Aktivator oder PKC-Inhibitor? .....	96
5.8	Die PI3K $\gamma$ ist in die Signalkaskade der frühen septischen Cholestase involviert ..	98
5.9	PKC-Inhibition als therapeutisches Konzept .....	99
5.9.1	Gö6850 .....	100
5.9.2	Gö6976 .....	101
5.9.3	PKC412 .....	103
5.10	Schlussfolgerung .....	105
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>117</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABCC2	<i>ATP-binding cassette sub-family C member 2</i>
AF	<i>Alexa Fluor dyes</i>
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AUROC	<i>area under receiver operating curve</i>
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AS605240	5-(6-Quinoxalinylmethylen)-2,4-thiazolidinedion
BCA	Bicinchoninsäure
BMAAD	Multikompartment Mizelle
BP	Blockierungspuffer
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CM	Cytokinmix
CMFDA	5-Chloromethylfluoresceindiacetat
CMV - Promoter	Cytomegalivirus - Promoter
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
EBAG9	<i>estrogen receptor binding fragment-associated antigen 9</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	Extrazellular-Signal regulierte Kinase
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin-Protein-Familie
fc	<i>fold change</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLDH	Glutamatdehydrogenase
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
Gö6850	Bisindolylmaleimid 1
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin

INR	<i>International normalized ratio</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug-resistance associated protein</i>
NfMLP	<i>N</i> -Formylmethionin-leucyl-phenylalanin
NHERF1	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
ORI	<i>Origin of replication</i>
OT	Objektträger
pDNA	Plasmid DNA
PFA	Paraformaldehyd
PHH	primäre humane Hepatozyten
PI3K $\gamma$	Phosphoinositid-3-Kinase $\gamma$
PKC	Proteinkinase-C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	<i>Photomultiplier Tube</i>
PP-1 $\alpha$ (C-19)	Protein-Phosphatase - 1 $\alpha$
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RCAS1	Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i> Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rT	reverse Transkriptase
RT q-PCR	<i>Real-Time-quantitative-PCR</i>
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
TAE-Puffer	TRIS-Acetate-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferter Kochsalzlösung
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	Untranslatierte Region
WP	Waschpuffer
ZKF	Zellkulturflasche
#	Katalognummer

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisation und Funktion sinusoidaler und kanalikulärer hepatozellulärer Transporter.....	6
Abbildung 2: Regulation der Internalisierung des kanalikulären Transporters MRP2 durch intrazelluläre Signalwege.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Grundgerüsts der Proteinkinase-C. ....	10
Abbildung 4: Übersicht der PKC-Isoformen. ....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von MRP2 und Radixin.....	13
Abbildung 6: Strukturüberblick über das Studiendesign der vorliegenden Arbeit. ....	16
Abbildung 7: Repräsentatives Elektropherogramm der isolierten RNA.....	21
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der angefertigten Objektträger.....	33
Abbildung 9: Strukturformeln und Reaktion von CMFDA, CMF, GSMF.....	35
Abbildung 10: Schematische Darstellung des verwendeten Radixin Plasmids RG207953. ....	36
Abbildung 11: Gelelektrophorese des isolierten Radixin Plasmids. ....	38
Abbildung 12: GFP-Radixin transfizierte HepG2-Zellen.....	42
Abbildung 13: Lebendzellmikroskopie. Stimulation einer GFP-Radixin transfizierten HepG2-Zelle mit 1 $\mu$ mol/l PMA.....	43
Abbildung 14: Auswertung der Intensitätsprofile nach Stimulation einer GFP-Radixin transfizierten HepG2-Zelle.....	43
Abbildung 15: Genexpressionsprofil der PKC-Isoformen in den verwendeten Zelllinien. ....	44
Abbildung 16: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit 100 nmol/l PMA.....	45
Abbildung 17: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit 100 nmol/l Bryostatin 1.....	46
Abbildung 18: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit 100 nmol/l <i>NfMLP</i> .....	47
Abbildung 19: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit Cytokinmix.....	48

Abbildung 20: Genexpressionsanaylse der klassischen <i>PRKCA</i> nach Stimulation. ....	49
Abbildung 21: Genexpressionsanaylse der neuen <i>PRKCD</i> nach Stimulation.....	50
Abbildung 22: Genexpressionsanaylse der neuen <i>PRKCE</i> nach Stimulation.....	51
Abbildung 23: Genexpressionsanaylse der neuen <i>PRKCH</i> nach Stimulation.....	52
Abbildung 24: Genexpressionsanaylse der neuen <i>PRKCQ</i> nach Stimulation. ....	53
Abbildung 25: Genexpressionsanaylse der atypischen <i>PRKCZ</i> nach Stimulation.....	54
Abbildung 26: Genexpressionsanaylse der atypischen <i>PRKCI</i> nach Stimulation.....	55
Abbildung 27: Genexpressionsanaylse der atypischen <i>PRKD1</i> nach Stimulation. ....	56
Abbildung 28: Genexpressionsanaylse des kanalikulären Transportproteins MRP2 nach Stimulation.....	57
Abbildung 29: Westernblot der PKC $\alpha$ und PKC $\zeta$ basal und nach Stimulation mit PKC- Aktivatoren in HepaRG-Zellen. ....	58
Abbildung 30: Repräsentativer Westernblot der PKC $\alpha$ in HepaRG-Zellen nach Stimulation mit PKC-Aktivatoren. ....	59
Abbildung 31: Repräsentativer Westernblot der PKC $\zeta$ in HepaRG-Zellen nach Stimulation mit PKC-Aktivatoren. ....	59
Abbildung 32: Densitometrische Auswertung der PKC $\alpha$ Banden. ....	60
Abbildung 33: Densitometrische Auswertung der PKC $\zeta$ Banden.....	61
Abbildung 34: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit PMA. ....	62
Abbildung 35: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit Bryostatin 1. ....	63
Abbildung 36: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit NfMLP. ....	63
Abbildung 37: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit PKC-Inhibitoren.....	64
Abbildung 38: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit Cytokinmix. ....	64



Abbildung 39: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit einzelnen Interleukinen des Cytokinmixes und Serum vom septischen Patienten. ....	65
Abbildung 40: Lichtmikroskopische Darstellung der Formation von HepaRG-Sphäroiden. ....	66
Abbildung 41: 8 HepaRG-Sphäroide (Tag 14) in einem Agarose Kegel, eingedeckt mit Paraffin. ....	66
Abbildung 42: HE gefärbte HepaRG-Sphäroide. ....	67
Abbildung 43: Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von MRP2 in einem HepaRG-Sphäroid. ....	68
Abbildung 44: Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von Radixin in einem HepaRG-Sphäroid. ....	68
Abbildung 45: Darstellung einer Auswertung von MRP2-gefärbten HepaRG-Zellen mit ImageJ. ....	69
Abbildung 46: <i>Integrated Density</i> von MRP2 nach Stimulation mit PMA und Bryostatin 1. ....	71
Abbildung 47: <i>Integrated Density</i> von MRP2 nach Stimulation mit NfMLP und PKC-Inhibitoren. ....	72
Abbildung 48: <i>Integrated Density</i> von MRP2 nach Stimulation mit Cytokinmix und Interleukinen. ....	73
Abbildung 49: Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von MRP2 und F-Aktin in stimulierten HepaRG-Zellen (20x). ....	74
Abbildung 50: Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von MRP2 und F-Aktin in stimulierten HepaRG-Zellen (63x). ....	75
Abbildung 51: Kofärbung von MRP2, RCAS1 und F-Aktin in HepaRG-Zellen (63x). ....	76
Abbildung 52: Kinetik der Exkretionsleistung von MRP2-Transportern in HepaRG Zellen über 100 Minuten. ....	77
Abbildung 53: Kinetik der Exkretionsleistung von MRP2-Transportern in HepaRG Zellen über 30 Minuten. ....	78
Abbildung 54: Lebendzellmikroskopie. Exkretionsleistung MRP2-Transportern in HepaRG-Zellen über 20 Minuten. ....	78

---

Abbildung 55 : Exkretionsleistung von MRP2-Transportern HepaRG-Zellen nach 16 stündiger Stimulation mit PMA und Bryostatin 1.....	79
Abbildung 56 : Exkretionsleistung von MRP2-Transportern HepaRG-Zellen nach 16 stündiger Stimulation mit NfMLP und PKC-Inhibitoren. ....	80
Abbildung 57 : Exkretionsleistung von MRP2-Transportern HepaRG-Zellen nach 16 stündiger Stimulation mit Cytokinmix. ....	81
Abbildung 58: Darstellung einer exemplarischen Auswertung der Lebendzellmikroskopie mit ImageJ.....	81
Abbildung 59: Schematische Übersicht der involvierten Pathomechanismen. ....	95

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mediumzusätze zur Kultivierung von Zellen.....	17
Tabelle 2: Stimulantien und ihre Konzentrationen. ....	19
Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer und die Gennamen der untersuchten Transkripte. ....	23
Tabelle 4: Primäre Antikörper. ....	34
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper. ....	34
Tabelle 6: Übersicht über die einzelnen Isoformen von Radixin und die Länge ihrer Sequenzen. ....	37
Tabelle 7: Workflow - Vorbereitung der Mizellen - pDNA - Komplexe. ....	39
Tabelle 8: Werte aus den erstellten Intensitätsprofilen einer fluoreszierenden, hepatozytären Membran.....	43
Tabelle 9: Beispielhafte Darstellung der ImageJ Analyse eines Bildes mit MRP2-gefärbten HepaRG-Zellen.....	70

# 1 Einleitung

## 1.1 Sepsis

Die Sepsis ist die schwerste Verlaufsform einer akuten Infektion. Sie wird als lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion definiert [1] und ist in Deutschland mit einer Inzidenz von 335/100.000 Einwohner vergleichbar mit der des Myokardinfarktes (300/100.000). Von 2007 bis 2013 war diese jährlich um circa 5% steigend [2]. Aufgrund der mit 10% hohen Wahrscheinlichkeit auf einer Intensivstation an einer Sepsis zu erkranken, sind die schwere Sepsis und der septische Schock die häufigsten Todesursachen kritisch kranker Patienten [3]. In 30-50% der Fälle ist das konsekutive Multiorganversagen Ursache für einen ungünstigen, klinischen Verlauf.

Ein Grund für die anhaltend hohe Mortalität und Zunahme der Inzidenz ist der demographische Wandel und der damit verbundene Anstieg von Morbidität in der alternden Gesellschaft [2]. Aber auch die Limitationen in der frühen Diagnostik und einer kausalen Therapie tragen dazu bei, dass die Sepsis nach wie vor ein schweres Krankheitsbild darstellt. Bisher sind keine Biomarker entdeckt, die die frühen zellulären Schädigungen im Krankheitsverlauf signalisieren und eine adäquate therapeutische Intervention ermöglichen könnten. Procalcitonin konnte sich als viel versprechender Biomarker für die Sepsis nicht durchsetzen [4, 5]. Die Therapie beruht auf der frühen Gabe von Antibiotika, einer Kreislaufstabilisation, O<sub>2</sub>-Gabe und Organersatzverfahren. Adjunktive, immunmodulatorische Sepsistherapeutika haben jedoch bisher keinen Einzug in die klinische Praxis gefunden [2].

Dennoch erfordern neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Sepsis in den letzten Jahren eine grundlegende Überarbeitung der Definition dieses Krankheitsbildes [6]. Bisher galt die systemische Entzündungsreaktion - *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) mit einer vermuteten oder nachgewiesenen Infektion als Sepsis-definierend. Die Kriterien der SIRS waren zwar sensitiv, jedoch nicht spezifisch für eine Sepsis. Die aktuelle *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) Konsensus Definition ‚**Sepsis-3**‘, die im Februar 2016 veröffentlicht wurde, stellt die fehlregulierte Wirtsantwort mit konsekutivem **Organversagen** in den Mittelpunkt [1].

Auch die klinischen Kriterien zur Diagnosestellung einer Sepsis wurden angepasst. Der *Sepsis-related Organ Failure Assessment score* (SOFA-Score) wird genutzt, um den Zustand von Patienten auf Intensivstationen zu beurteilen. Die Einschätzung berücksichtigt die pathophysiologische Auslenkung sechs verschiedener Werte, die mit Punktzahlen (1-4) klassifiziert werden. Der berechnete Wert soll die Funktionalität oder das Versagen unterschiedlicher Organsysteme abbilden [7]:

- › respiratorisches System - Oxygenierungsindex,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  (mmHg)
- › Koagulation - Thrombozytenanzahl
- › hepatisches System - Bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )
- › kardiovaskuläres System - mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)
- › Neurologie - Glasgow Coma Scale
- › renales System - Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )

Eine Sepsis liegt vor, wenn sich der SOFA-Score des Patienten akut um zwei oder mehr Punkte verschlechtert. Ein Anstieg des Werts um 2 Punkte ergab in früheren Studien eine Zunahme der statistischen Mortalität um 10%, ein Testwert  $> 11$  eine Mortalität von  $> 90\%$  [8]. Der septische Schock wird durch zwei zusätzliche Kriterien definiert. Die Notwendigkeit der Therapie mit Vasopressoren, um einen mittleren arteriellen Blutdruck von mindestens 65 mmHg aufrecht zu erhalten und persistierend erhöhte Serumlaktatwerte  $> 2$  mmol/l nach ausreichender Flüssigkeitszufuhr waren mit einem signifikanten Anstieg der Mortalitätsrate auf 42%, verglichen mit 10 % bei einfacher Sepsis, assoziiert [9]. Es konnte gezeigt werden, dass die neuen SOFA-Kriterien die Mortalität von septischen Patienten auf Intensivstationen besser vorhersagen als die früheren SIRS-Kriterien (Area Under Receiver Operating Characteristic Curve, AUROC: SIRS = 0,64 vs SOFA = 0,74) [10].

Die bisher verwendete und in den hier zitierten Arbeiten genutzte Definition ‚**Sepsis-2**‘ von Bone *et al.* aus dem Jahr 1992 orientierte sich an dem damals aktuellen Sepsis-Modell, das den Fokus auf die Infektion legte und die Sepsis als Kontinuum verstand. Einer Inflammation (SIRS) folgte die Organdysfunktion (schwere Sepsis), die mit einer zusätzlichen Hypotension (kardiovaskuläres Versagen) im septischen Schock resultierte [11]. Im Jahr 1997 wurde dieses Modell um das *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) erweitert, da vermutet wurde, dass sich dem proinflammatorischen Cytokinsturm eine anti-inflammatorische Phase anschloss. Man nahm an, dass der Verlust des Gleichgewichts dieser beiden Systeme eine Suppression der adaptiven Immunantwort mit weitreichenden Folgen verursachte [12].

Im Jahr 2011 entwarfen Xiao *et al.* das Konzept des *genomic storm*: Unabhängig von der Art führt demnach ein primäres Ereignis (Infektion, Trauma, Verbrennung) zu einer simultanen Expressionsänderung einer Vielzahl antiinflammatorischer Transkripte und der adaptiven Immunität. Parallel erfahren auch Bestandteile des angeborenen Immunsystems proinflammatorische Transkriptomveränderungen. Schwere Krankheitsverläufe (Dauer > 14 Tage oder Versterben der Patienten) hingen von der Dauer bis zur Normalisierung der Genexpression und dem Ausmaß der Regulierung ab [13]. Auf der einen Seite scheint die Sepsis also ein vom Immunsystem lokal nicht kontrollierbarer Infekt zu sein, auf der anderen Seite triggert die systemische Ausbreitung eine Hyperinflammation in der auf den Infekt antwortende Immunzellen insbesondere nach Transmigration in Organgewebe zu einer Verschlechterung des Zustands beitragen. Die überschießende Immunreaktion führt zu einer bisher nicht vollständig geklärten Immunsuppression [14, 15].

Die neue Definition ‚**Sepsis-3**‘ orientiert sich am aktuellen Verständnis der zellulären Pathophysiologie. Die Kombination des mikrobiologischen Modells (Infektion-Cytokinfreisetzung) und des immunologischen Modells (Aktivierung von pro- und antiinflammatorischen Komponenten des Immunsystems) ist ein Ansatz, um die dysregulierte zelluläre Aktivität (Organversagen) zu erfassen [16]. Der septische Schock wird als klinisches Syndrom integriert: Infektiösen und nicht-infektiösen Stimuli (Trauma, Verbrennung, ischämische Reperfusion) folgen ähnliche Signalkaskaden, die nach Aktivierung des Immunsystems zu Zellnekrosen führen [6]. Viele Bestandteile dieser Pathomechanismen sind bis *dato* nicht identifiziert. Ein tieferer Einblick in die intrazelluläre Signaltransduktion ist nötig, um neue therapeutische Strategien gegen die Sepsis zu entwickeln [14].

### 1.2 Die Leber in der Sepsis

Die Leber spielt in der Regulation der Immunantwort eine zentrale Rolle. Sie dient als Quelle für inflammatorische Mediatoren und beseitigt Bakterien und Endotoxine aus dem Körperkreislauf [17]. Hepatische Dysfunktion und Cholestase treten im Zuge einer Sepsis häufig und früh auf und korrelieren mit einem schlechten Outcome (Organversagen, Tod). Aus diesem Grund wird der Leber in der Pathogenese der Sepsis eine entscheidende Rolle zugesprochen [18]. Das septische Leberversagen lässt sich in zwei zeitlich versetzte Stadien einteilen.

Die primäre Infektion (extrahepatisch) mit meist Gram-negativen, Endotoxin-produzierenden Bakterien resultiert in einer funktionellen Hypoperfusion der Leber, akutem Zellverlust und einem Absinken der enzymatischen Funktion im Hinblick auf Biotransformation und Galleformation [19-21]. Dies induziert unter anderem in den Kupffer-Zellen eine Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  [22]. Als Folge von Downstream-Mechanismen der inflammatorischen Kaskade kommt es zur sekundären intrahepatischen Dysfunktion (Anstieg des Serumbilirubins), der Sepsis-assoziierten Cholestase, die konsekutiv zum Leberversagen führen kann. Das pathophysiologische Korrelat ist die Einschränkung des hepatobiliären Transports und der Gallesekretion durch proinflammatorische Cytokine [19].

Die Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) induzierten Cytokine sind potente Inhibitoren der hepato- und cholangiozellulären Transportsysteme; sie reduzieren Gallefluss und Exkretion von Xenobiotika und deren Metabolite [23]. Die Gabe von Tumor-Nekrose-Faktor führt beim Menschen zu einer Cholestase mit erhöhtem Serumbilirubin [24]. Teleologisch kann die Entzündungs-induzierte Cholestase als Teil der negativen Akuten-Phase Antwort des Immunsystems interpretiert werden (Herabregulierung der Transportergene zugunsten einer Hochregulierung der in Inflammation und Immunantwort involvierten Gene) Die Leber reguliert aus kapazitären und energiephysiologischen Gründen den einen Prozess (Biotransformation) zugunsten des anderen (Akute-Phase-Reaktion) herab [25].

Im klinischen Alltag kann die Einschränkung der hepatozellulären Integrität im Zuge einer Sepsis anhand von Parametern der Organdysfunktion abgeschätzt werden. Sie geben Aufschluss über das Ausmaß einer zellulären Schädigung und finden Anwendung in der Differenzierung zwischen Erkrankungen der Leber und der Gallenwege. Die Aktivität der Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Glutamatdehydrogenase (GLDH) lassen eine Abschätzung des Zelluntergangs und somit der Schwere des Leberschadens zu, da sie in gesunden Zellen obligat intrazellulär lokalisiert sind. ALAT und GLDH sind leberspezifisch, ASAT ist sowohl weniger sensitiv als auch unspezifisch für die Leber [26]. Die verringerte hepatische Mikrozirkulation im septischen Geschehen induziert zelluläre und mitochondriale Schäden, die zu einer akuten Elevation der Transaminasen führen kann [27]. Die Gamma-Glutamyl-Transpeptidase ( $\gamma$ -GT) ist in hoher Konzentration in Hepatozyten und biliären Epithelzellen nachweisbar. Eine Serumerhöhung der membranständigen  $\gamma$ -GT gemeinsam mit einem Anstieg der Alkalischen Phosphatase (AP) ist als Frühmarker charakteristisch für cholestatische Erkrankungen [26].

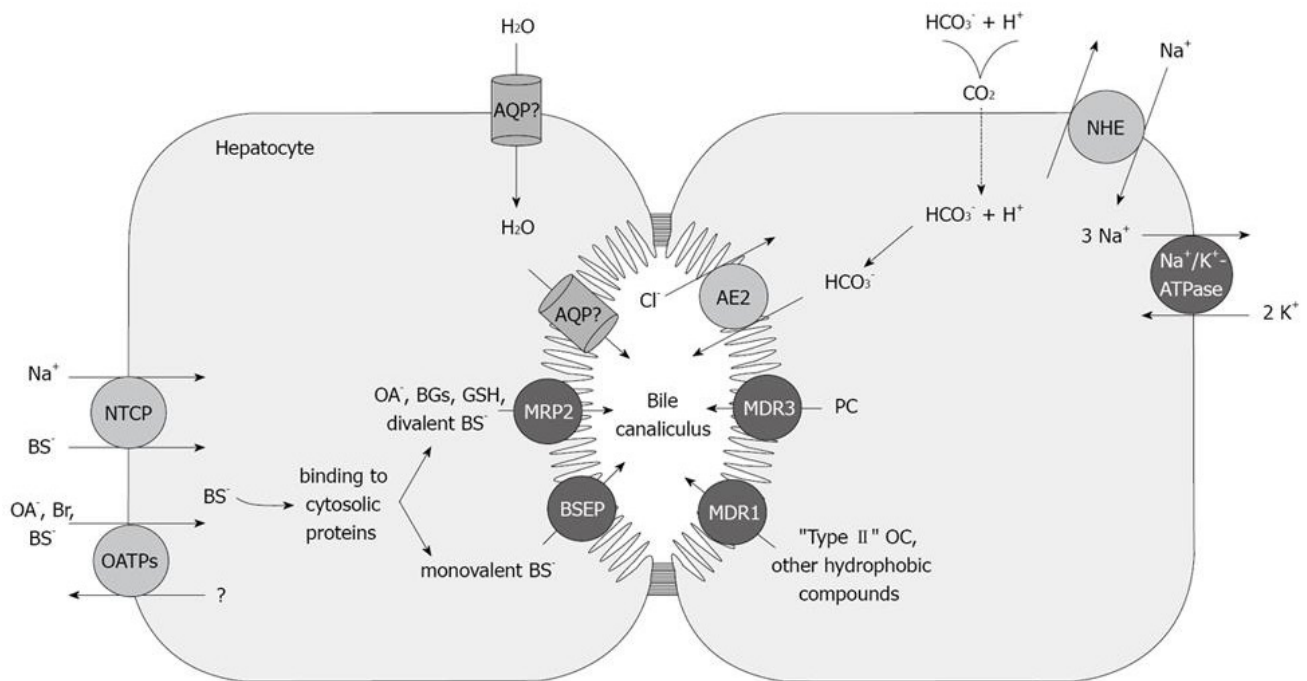
Die in allen humanen Zellen vorkommende Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein klinisch relevanter Marker für eine pathologische Zelllyse, da sie mit dem Ausmaß des Zellschadens korreliert. Die Elevation der Plasma-LDH Werte im septischen Verlauf ist ein häufiges aber unspezifisches Ereignis. Über 48 Stunden erhöhte LDH Werte sind sensitiv und spezifisch für die Vorhersage der Mortalität von Patienten mit einer schweren Sepsis [28]. Laktat, das Endprodukt der anaeroben Glykolyse, ist als Ischämie-Marker im klinischen Alltag etabliert. Die metabolische Azidose mit erhöhten Laktatwerten war nach 1992 Sepsis-definierend, die dritte Internationale Konsensus Konferenz 2016 maß diesem zellulären Marker, als septischen Schock-definierend, eine noch entscheidendere Bedeutung bei [9, 11].

### 1.3 Hepatozellulärer Galletransport

Die metabolische Funktion der Leber wird durch ihre besondere Lage zwischen Körperkreislauf und Verdauungstrakt deutlich. Über die *Vena portae* gelangen die in der Magen-Darm-Passage resorbierten Substanzen in die Leber. Als zentrales Stoffwechselorgan ist die Leber an der Synthese von Gallen- und Fettsäuren, der Proteinsynthese, sowie der Entgiftung (Harnstoffzyklus, Phase-I- und Phase-II-Transformationsreaktionen) und Biotransformation von Medikamenten beteiligt. Hydrophile Konjugate werden über die Galle wieder in den Darm abgegeben. Die metabolisch aktiven, parenchymalen Hepatozyten besitzen eine ausgeprägte Polarität. Die kanalikuläre Membrandomäne bildet mit jeweils einer Nachbarzelle einen *Canaliculus bilifer*. Sie trägt zahlreiche Mikrovilli und sezerniert Gallenflüssigkeit. Die basolaterale Membrandomäne grenzt an den Disse'schen Spaltraum und ist über die Lebersinusoide für den Stoffaustausch mit dem Blut verantwortlich. Zu den Nicht-Parenchymalen Leberzellen zählen die Kupffer-Zellen, hoch spezialisierte Makrophagen, die aus dem Pfortader-Blut zirkulierende Bakterien und inflammatorische Cytokine abbauen; Ito Zellen im Disse'schen Raum, die Vitamin A und Fett enthalten und die Mikrozirkulation sowie die Immunantwort regulieren sowie sinusoidale Endothelzellen, die das Parenchym vom Blutfluss trennen [29]. Die Biosynthese, der Intermediärstoffwechsel und die Exkretion der Gallensäuren sind ein komplexes System, das von hepatobiliären Transportsystemen sowie einem intaktem Cytoskelett abhängig ist. Unter physiologischen Zuständen ermöglicht ein dichtes Netz von kanalikulären Mikrovilli die Exkretion von osmotisch aktiven Substanzen und dem parazellulären Transport von Wasser in den *Canaliculus bilifer*. Die Gallensäuren werden im Hepatozyten *de novo* synthetisiert oder aus dem sinusoidalen Blut aufgenommen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Formation der Galle.



So konnte gezeigt werden, dass schon 24 Stunden nach Beginn einer schweren Sepsis eine im Blut gemessene Elevation der Gallensalze CDCA und TDCA die 28-Tages-Mortalität mit einer höheren Sensitivität und Spezifität voraussagt (AUROC 0,87), als das Serumbilirubin (AUROC 0,59) [30]. **Abbildung 1** gibt einen Überblick über die an der Galleformation beteiligten Transporter.



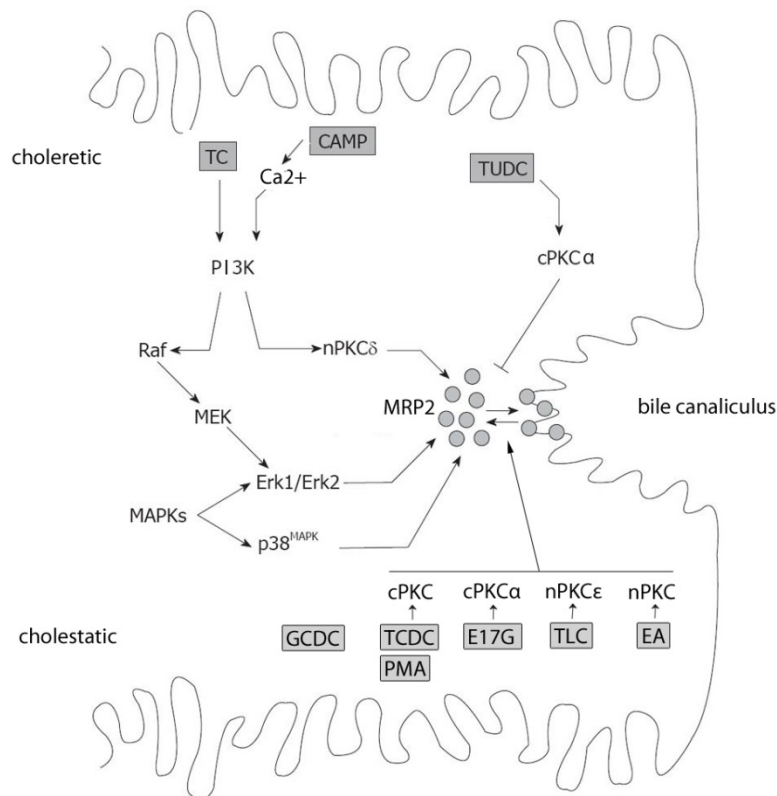
**Abbildung 1: Lokalisation und Funktion sinusoidaler und kanalikulärer hepatozellulärer Transporter.** Die Distribution von Gallensäuren und anderen organischen Anionen zwischen den einzelnen Kompartimenten ist als Resultat komplexer Synthese- und Transportvorgänge zu betrachten. In der sinusoidalen (basolateralen) Membran befinden sich die *organic-anion-transport-proteins* (OATP), die bidirektional den multispezifischen Transport von Gallensalzen (BS) und organischen Anionen (Bilirubin, Kationen) über Co-Transportmechanismen katalysieren. Beim Menschen sind dies vor allem OATP1, 2 und 8. *Na<sup>+</sup>-taurocholate-cotransporting polypeptide* (NTCP) vermittelt die Aufnahme der physiologisch vorkommenden Gallensalze und Gallensalzkonjugate in den Hepatozyten. Die sinusoidalen sekundär aktiven Transportproteine (hellgrau) nutzen den von der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aufgebauten Na<sup>+</sup>- Gradienten zur Substrataufnahme (NHE - Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter). Kanalikulär (apikal) dominieren die ATP-abhängigen Transporter (dunkelgrau). Die *bile-salt-export-pump* (BSEP), transportiert den Großteil aller Gallensäuren. Die Phospholipid-Flippase *multidrug-resistance-protein 3* (MDR3) vermittelt die Translokation von Phosphatidylcholin und einiger Xenobiotika. Der multispezifische Transporter *multidrug-resistance-associated protein 2* (MRP2) sezerniert ein breites Spektrum organischer Anionen, Gallensalze, Xenobiotika und Glutathion (GSH). Der Xenobiotikatransporter *p-glycoprotein multi-drug-resistance protein 1* (MDR1) transportiert Kationen als einer der Haupteffektoren der Xenobiotikaexkretion. Der Anionentransporter *anion exchanger* (AE2) reguliert mit der Bikarbonatexkretion (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) den pH-Wert und fördert den Gallensalz-unabhängigen Gallenfluss. Die Rolle der Aquaporine (AQP) in der humanen Leber ist noch nicht genauer charakterisiert. Darstellung adaptiert aus: Roma, M.G *et al.* *Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease*. World J Gastroenterol, 2008 [31].

Für die Aufnahme und Exkretion endogener Metaboliten (Gallensäuren, Steroidhormone) sowie unterschiedlichster Xenobiotika sind zwei polarisierende Gruppen von Transportproteinen verantwortlich: die energieunabhängigen *solute carriers* (SLC) auf der sinusoidalen Membran und die *ATP-binding-cassette* (ABC) Transportproteine auf der kanalikulären Seite. Die Gruppe der ATP-abhängigen, primär aktiven Transporter ist für die kanalikuläre Sekretion zuständig und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des hepatobiliären Systems dar [32]. Dabei wird *multidrug-resistance-associated protein 2* (ABCC2/MRP2) als Schlüsseltransporter in der Galleformation und unabhängigem Gallefluss angesehen. Menschen mit einer Genmutation für dieses Protein entwickeln den Phänotyp des *Dubin-Johnson* Syndroms. MRP2 ist bei dieser autosomal-rezessiven Erkrankung nicht funktionstüchtig, so dass konjugiertes Bilirubin im Hepatozyten akkumuliert. Die Folgen sind Ikterus und intermittierende Hyperbilirubinämien [33].

Kortgen *et al.* konnte 2009 in einem Sepsis-Modell in humanem Lebergewebe einen Unterschied in der Genexpression von hepatozellulären Transportern nachweisen und einen funktionellen Zusammenhang zur exkretorischen Dysfunktion der Leber herstellen. Die Hochregulierung der Transkriptrate von *organic-anion-transport-protein 1* (OATP1) und die Herabregulierung von MRP2, *multidrug-resistance-associated protein 3* (MDR3) und *anion exchanger 2* (AE2) deuten auf eine erhaltene Aufnahme aus dem sinusoidalen Blutfluss bei gleichzeitiger substantieller Einschränkung der Exkretionskapazität hin [34]. Diese Theorie wird weiter untermauert durch Ergebnissen von Studien, die bei septischen Mäusen neben einer massiven exkretorischen Dysfunktion einen Verlust der kanalikulären Mikrovilli und einen Rückzug von MRP2-Vesikeln in das Cytosol nachweisen konnten [30].

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) scheint als verantwortliches Cytokin für die Internalisierung von MRP2 bewiesen. Im experimentelle Setting konnte die Blockade der IL1- $\beta$  Aktivität im Rahmen einer Endotoxin-induzierten Cholestase der Herabregulierung der Genexpression des MRP2-Transporters vollständig vorbeugen [35, 36]. Die zu Grunde liegende Signaltransduktion der Reduktion von kanalikulären und sinusoidalen Transportern durch proinflammatorische Cytokine sind noch nicht erklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Genauer charakterisiert hingegen sind die Signalwege, die unter physiologischen Zuständen von Gallensäuren aktiviert werden und die Translokation von Transportern regulieren. Choleretisch sowie cholestatisch wirkende Substanzen lösen ähnliche intrazelluläre Signalkaskaden aus. Dazu zählt die Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ), die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Isoformen der Proteinkinase-C (PKC) [30, 37, 38].

**Abbildung 2** gibt einen Überblick über die involvierte Signaltransduktion zur Regulation der Membraneinbettung von MRP2.



**Abbildung 2: Regulation der Internalisierung des kanalikulären Transporters MRP2 durch intrazelluläre Signalwege.** Choleretische Substanzen : Taurocholat (TC), Tauroursodeoxycholsäure (TUDC), Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) Cholestatische Substanzen : Glykochenodeoxycholsäure (GCDC), Taurochenodeoxycholsäure (TCDC), Estradiol 17-(β-D-glucuronid (E17G), Tauroolithocholsäure (TLC), Etacrynsäure (EA) Invlovierte Signaltraduktionswege: Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), klassische Proteinkinase-C (cPKC), neue Proteinkinase-C (nPKC), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK), *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF), MAPK-Kinase (MEK), Extrazellulär-Signal regulierte Kinase (ERK). Darstellung adaptiert aus: Roma, M.G *et al.* *Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease.* World J Gastroenterol, 2008 [31].

Die Aktivierung von cAMP führt zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels und zur Aktivierung von PI3K. PI3K reguliert die Insertion des kanalikulären Transporters MRP2 durch Aktivierung der PKC  $\delta$  und der Raf-MAPK-Erk1/2 Signaltransduktion. Die Gallensäure Taurocholat (TC) aktiviert ebenso die PI3K. Tauroursodeoxycholsäure (TUDC) vermittelt einen vermehrten Einbau von MRP2 in die kanalikuläre Membran über PKC  $\alpha$  [39]. Tauroolithocholsäure (TLC) wirkt cholestatisch, es aktiviert PKC  $\epsilon$  und inhibiert PKC  $\alpha$ . Die Aktivierung von PKC  $\epsilon$  verursacht in Hepatozyten eine reduzierte Kapazität zur Gallesekretion [40]. Estradiol 17-(β-D-glucuronid) (E17G), ein Metabolit des Östrogens, hat ebenso cholestatische Effekte [41].

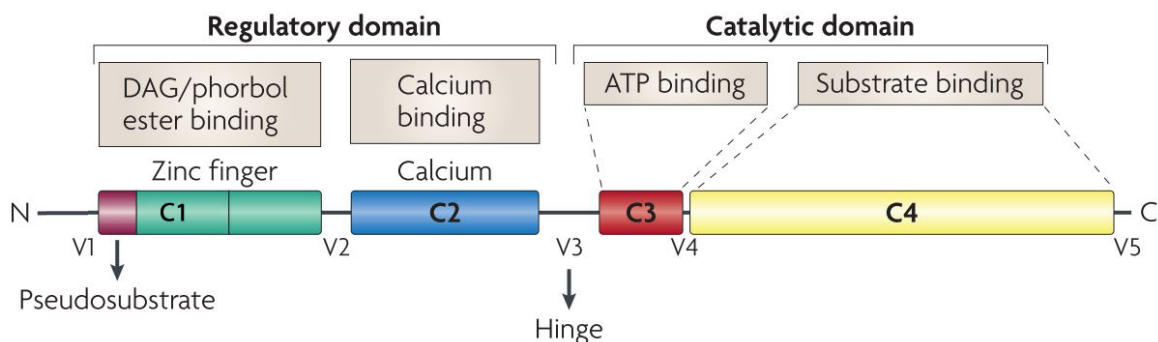
Über die Aktivierung von klassischen Proteinkinase-C-Isoformen und p38-MAPK auf der einen und des PI3K-Erk1/2 Signalweges auf der anderen Seite bewirkt es die Internalisierung kanalikulärer Transportproteine [38]. In einer Leberzelllinie (HepG2) sowie in perfundierter Rattenleber konnte eine Reduktion der Gallesekretion durch Taurochenodeoxycholsäure (TCDC) über die Aktivierung von Proteinkinase-C-Isoformen nachgewiesen werden [42]. Hydrophobe Gallensalze können Nekrose oder Apoptose induzieren. Eine PKC-Inhibition beugte der TCDC-induzierten Nekrose signifikant vor [43]. Die Stimulation von primären Rattenhepatozyten mit Etacrynsäure (EA) zeigte eine Translokation der PKC-Isoformen  $\delta$  und  $\varepsilon$  und resultierte in der Internalisierung von MRP2. Das spezifische Zielprotein der Phosphorylierung durch PKC-Isoformen konnte nicht identifiziert werden [44].

Auf der Grundlage des Wissens über diese physiologischen Prozesse der Gallesekretion und die involvierte Signaltransduktion werden verschiedene pathophysiologische Modelle diskutiert, die auf molekularer Ebene an der Entstehung einer septischen Cholestase beteiligt sind. Es scheint jedoch offensichtlich, dass nicht nur eine einzelne Signalkaskade für diese Vorgänge verantwortlich sein kann. Vielmehr bedingt eine Aktivierung verschiedener Signalkaskaden in den Hepatozyten eine Internalisierung sinusoidaler und kanalikulärer Transporter und resultiert im Versagen der Sekretion in die Gallenkanäle.

### 1.4 Isoformen der Proteinkinase-C

Aufgrund unterschiedlicher Aktivierungsmechanismen werden die Isoformen der Proteinkinase-C in unterschiedliche Gruppen unterteilt und mit Buchstaben des griechischen Alphabets bezeichnet. Sie unterscheiden sich darüber hinaus in ihrer gewebsspezifischen Expression, der subzellulären Lokalisation und der Substratspezifität. Einzelne Isoformen regulieren spezifische, aber auch teilweise überlappende Funktionen, welche durch die Übertragung von Phosphat auf die Aminosäuren Serin oder Threonin ausgelöst werden. Dabei sind Proteine zur Regulation der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose *target* Strukturen der Isoformen. Insbesondere Proteine, die zur Assemblierung des Cytoskeletts beitragen, werden durch PKC-Isoformen phosphoryliert und damit in ihrem Aktivitätszustand verändert.

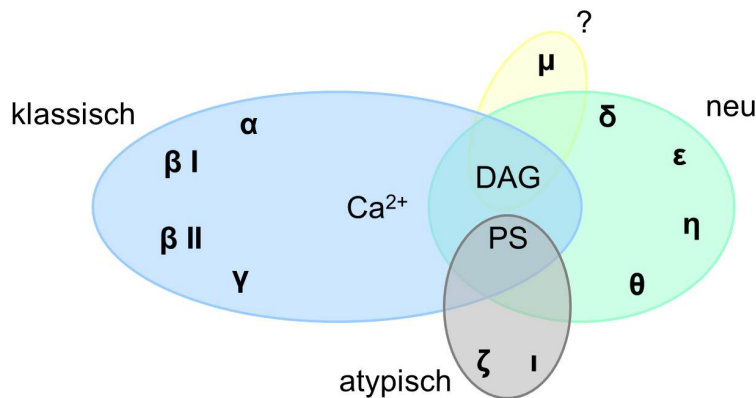
Unterschiedliche Isoformen haben in Hepatozyten teilweise gegensätzliche Effekte auf die exkretorische Leistung. Cholestatische Cytokine und Gallensalze sowie choleretisch wirksame Substanzen aktivieren teilweise dieselben intrazellulären Signalwege mit unterschiedlicher Auswirkung. Die Signalverarbeitung durch verschiedene Isoformen der PKC Familie könnte einer der Gründe dafür sein. **Abbildung 3** zeigt das Grundgerüst der Proteinkinase-C.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Grundgerüsts der Proteinkinase-C.** Proteindomäne C1=Bindungsstelle für Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin (PS); C2=Bindungsstelle für saure Lipide und Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ); C3=Bindungsstelle für ATP; C4: Bindungsstelle für Substrate. Adaptiert aus: Mackay, H.J *et al.* *Targeting the protein kinase C family: are we there yet?* Nat Rev Cancer, 2007 [45].

Die Proteinkinase-C ist ein einsträngiges Polypeptid und enthält eine regulatorische N-terminale (20-40 kDa) und eine katalytische C-terminalen Region (45 kDa) [46]. Die Klonierung der ersten Isoenzyme (alpha, beta und gamma) Mitte der 1980er Jahre enthüllte vier Proteindomänen (C1-C4) mit stabiler und kompakter Faltungsstruktur, die funktional und strukturell unabhängig von benachbarten Abschnitten sind. Diese vier Domänen sind durch variable Regionen verknüpft (V1-V5) [47, 48].

Die PKC Familie besteht aus mindestens 10 Isoformen. Die regulatorisch-aktivierende Region ist isoformspezifisch und wegweisend für die Gruppenzuordnung (siehe **Abbildung 4**). Sie enthält die Proteindomänen C1, C2 und eine Pseudosubstratsequenz mit einem nicht phosphorylierbaren Alaninrest. Die C1 Domäne der klassischen und neuen Isoformen enthält cysteinreiche Motive, die eine Bindung von Diacylglycerol (DAG) und Phorbolestern als metabolisch stabiles Strukturanalogon ermöglichen. Der *second messenger* DAG ist ein Produkt der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) durch das membrangebundene Enzym Phospholipase C (PLC). Beide Lipide fungieren als hydrophobe Anker der Proteinkinase in der Zellmembran.



**Abbildung 4: Übersicht der PKC-Isoformen.** Klassische Isoformen (alpha- $\alpha$ , beta1- $\beta$ I, beta2- $\beta$ II, gamma- $\gamma$ ) werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig aktiviert. Neue Isoformen (delta- $\delta$ , epsilon- $\epsilon$ , eta- $\eta$ , theta- $\theta$ ) benötigen kein  $\text{Ca}^{2+}$ . Atypische Isoformen (zeta- $\zeta$ , iota- $\iota$ ) werden über den Kontakt zu Phospholipiden in der Membran aktiviert. PKC  $\mu$  wird über DAG aktiviert und zählt zu der PKD-Subfamilie. Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Diacylglycerol (DAG), Phosphatidylserin (PS).

Die C2 Domäne der **klassischen** ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) Proteinkinase-C-Isoformen besitzt eine Bindungsstelle für Kalziumionen. Die kalziumabhängige Aktivierung beruht auf der erhöhten Affinität für saure Lipide nach der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ .

Die C2 Domäne der **neuen** ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) PKC-Isoformen besitzt keine funktionell aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne. Sie werden kalziumunabhängig aktiviert.

Die C1 Domäne der **atypischen** ( $\zeta$ ,  $\iota$ ) Isoformen besitzt nur ein cysteinreiches Motiv, eine Bindung von DAG oder Phorbolestern konnte bisher nicht detektiert werden. Die Aktivierung dieser Isoformen erfolgt lediglich durch eine Translokation vom Cytosol an die Zellmembran und den Kontakt mit Phosphatidylserin. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid und Komponente der Zellmembran [45, 46].

In einigen Veröffentlichungen wird PKC  $\mu$  als elfte Isoform diskutiert [49]. Ein PKC-ähnliches Aktivierungsmuster durch Phorbol ester und DAG konnte zwar gezeigt werden, die Sequenz der katalytischen Domäne unterscheidet sich jedoch wesentlich von der katalytischen Einheit der Proteinkinase-C [50]. Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität wird PKC  $\mu$  / PKD 1 auch zur Subfamilie der Proteinkinase D gezählt [51].

Die katalytische Region ermöglicht die Ausführung verschiedener Funktionen einer Proteinkinase. Die Mikrostruktur der katalytischen Region zeigt bei den eukaryotischen Proteinkinasen einen ähnlichen Grundaufbau. Die Aminosäuresequenz dieses Abschnitts gleicht sich unter den verschiedenen Kinasen bis zu 40 % [52].

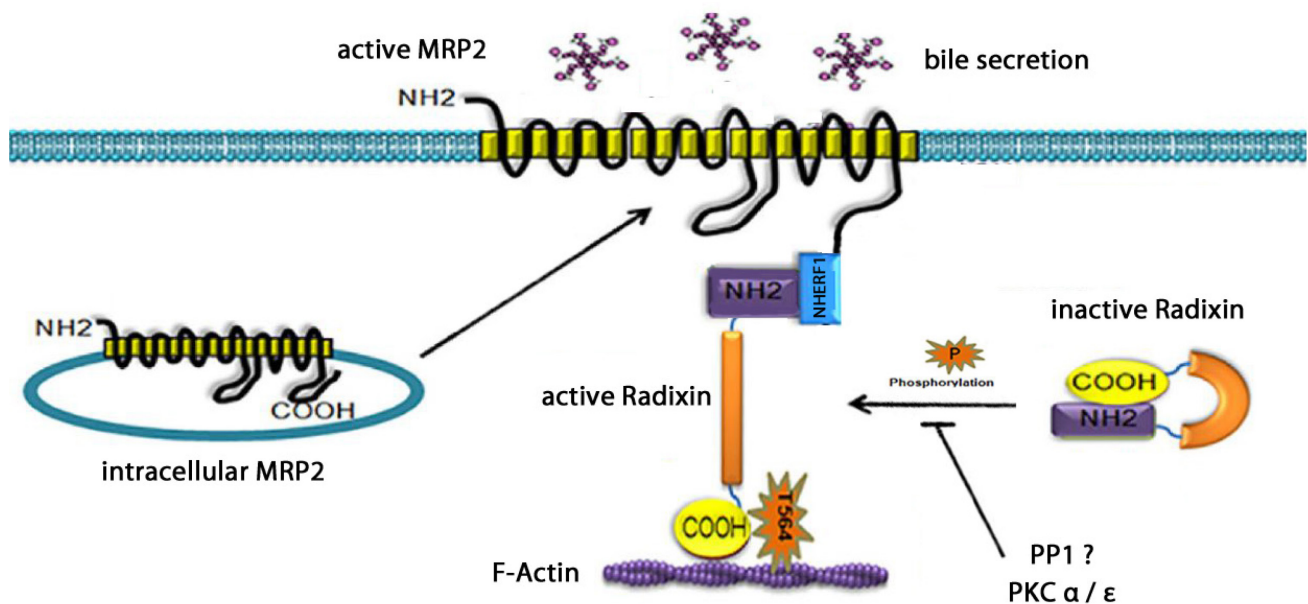
Sämtliche Isoformen der PKC enthalten die hochkonservierte, katalytische Region, bestehend aus den Proteindomänen C3 und C4. Die Domäne C3 enthält die ATP-bindende Region, die Domäne C4 die substratbindende Region [53]. Die substratbindende Tasche von C4 ist im inaktiven Stadium der Kinase durch das enzymeigene Pseudosubstrat blockiert. Die Kopplungsregion (Hinge - V3) wird durch Membraninteraktion proteolytisch aktiv und spaltet das autoinhibitorische Pseudosubstrat [54]. Im aktiven Zustand kann die PKC Substratproteine phosphorylieren, die die Konsensussequenz der basischen Aminosäuren Serin oder Threonin enthalten (-X-Arg-X-X-(**Ser/Thr**)-Hyd-Arg-X-). Hyd steht hier für den Rest einer hydrophoben Aminosäure. Eine Phosphorylierung der katalytischen Region ist Voraussetzung für diesen aktiven Zustand. Zusätzlich werden isoenzymspezifische Ankerproteine - *receptors for activated C-kinase* (RACK) vermutet, um diese komplexen allosterischen Wechselwirkungen zu ermöglichen [55]. Die Translokation der PKC vom Cytosol an die Zellmembran kann als selektives *readout* für die Aktivierung verwendet werden [56]. Aufgrund der gegensätzlichen Konsequenzen, die einer PKC-Aktivierung folgen, sind die Proteinkinasen interessante Zielproteine für therapeutische Angriffspunkte.

In primären humanen Hepatozyten (PHH) sowie in der HepaRG-Zelllinie sind nicht alle PKC-Isoformen exprimiert, das Expressionsmuster wird diskutiert. Für die klassische Isoform  $\alpha$  und die atypische  $\zeta$  und  $\iota$  konnte eine hohe, für die neuen Isoformen  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\eta$  eine etwas geringere Expression gezeigt werden. Das ähnliche Expressionsprofil der PKC-Isoformen in PHH und HepaRG-Zellen korrelierte (*Spearman's rank* Koeffizient 0,92  $p < 0,001$ ). Der neuen PKC  $\theta$  konnte nur eine niedrige Expression nachgewiesen werden. Die klassische PKC  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$  wurde in keiner der beiden Zellarten exprimiert [57].



### 1.5 Phosphorylierungsstatus von Radixin und MRP2-Membraninsertion

Die Translokation von MRP2-Transportern und ihre Insertion in die Membran der kanalikulären Mikrovilli ist Voraussetzung für die Sekretion der Galle. Für die funktionale Stabilisierung von MRP2 in der Membran ist der Transporter über Radixin am Cytoskelett der Zelle verankert [58]. **Abbildung 5** gibt einen schematischen Überblick über die involvierten Strukturen.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von MRP2 und Radixin.** Inaktives Radixin bildet intrazellulär eine geschlossene Ringstruktur. Die Phosphorylierung der COOH-terminalen Aminosäure Threonin (T564) aktiviert Radixin. Über den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Regulatory Factor (NHERF1) bindet es an membranäres MRP2. Das aktivierte Radixin wird für die Translokation von MRP2 benötigt. Über die COOH-terminale Bindung zum Cytoskelett (F-Aktin) stabilisiert Radixin MRP2 in der kanalikulären Membran und ermöglicht die Gallesekretion. Ein möglicher Einfluss von Phosphatase 1 (PP1) und  $\text{PKC } \alpha / \epsilon$  wird diskutiert. Schema adaptiert aus: Karvar, S. et al. *Distribution dynamics and functional importance of NHERF1 in regulation of Mrp-2 trafficking in hepatocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014 [59].

Radixin ist ein Strukturprotein, das die Membran und das Cytoskelett von F-Aktin-reichen Zellstrukturen verbindet. Strukturell ist es Teil der Ezrin-Radixin-Moesin-Protein-Familie (ERM). Radixin wird eine wichtige Rolle in der Cytoskelettorganisation, Zellmotilität, -adhäsion und -proliferation zugesprochen. N-terminal bindet es über  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Regulatory Factor (NHERF1) an die Membran, C-terminal besitzt es eine F-Aktin Bindungskomponente [60].



In den Mikrovilli von Hepatozyten ist Radixin das dominierende Strukturprotein [61]. Die physiologische Kolokalisation der beiden Proteine (Radixin und MRP2) an der kanalikulären Plasmamembran wird durch inflammatorische Stimuli aufgehoben [62]. Der Defekt des Strukturkomplexes führt zu konjugierter Hyperbilirubinämie, ähnlich dem oben beschriebenen *Dubin-Johnson* Syndrom [63]. Als Ursache der Cholestase wird vermutet, dass MRP2 sowie Radixin im Zuge der Inflammation in cytosolischen Vesikeln akkumulieren. Unklar bleibt, ob für diesen dysfunktionalen Mechanismus ein signalvermittelter Rückzug von der Membran oder eine fehlerhafte Translokation zur Membran verantwortlich ist. Letztere könnte durch die abnehmende Polarität im Hepatozyten erklärt werden [30, 64].

Eine Zunahme der Exkretion über MRP2 durch Phosphorylierung des Transporters mit der klassischen PKC  $\alpha$  konnte gezeigt werden; Anhalt für den Einfluss auf die intrazelluläre Translokation bot sich bisher nicht [65]. Der **Phosphorylierungsstatus von Radixin** hingegen scheint für die Membranverankerung von MRP2 ausschlaggebend zu sein. Die Transfektion der Rattenleberzelllinie WIF-B mit einer nicht-phosphorylierbaren Radixin-Mutante führte zu einem cholestatischen Phänotyp [66]. Einer von Anwer *et al.* 2014 entwickelten Theorie zur Folge wird Radixin von der Phosphatase1 (PP1) dephosphoryliert. Die Aktivität der PP1 wird von der klassischen PKC  $\alpha$  oder  $\varepsilon$  reguliert [56]. Die Stimulation der klassischen PKC  $\alpha$  in Hepatozyten durch Phorbol ester resultierte in einem Rückzug von kanalikulären Transportern in das Cytosol und führte zu der damit assoziierten Cholestase [67].

Der Erforschung der Signalkaskade, die -im septischen Geschehen- zur hepatozytären Cholestase führt, wird vermehrt Aufmerksamkeit gewidmet, die ursächlichen, intrazellulären Vorgänge sind jedoch nur unzureichend geklärt. Die bis jetzt erfassten und beschriebenen Mechanismen stellen die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit aufgestellten und untersuchten Hypothesen dar.

## 2 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Eine Cholestase im Verlauf einer Wirtsreaktion auf eine schwere Infektion ist mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko vergesellschaftet. Eine Resolution der hepatischen Exkretionsleistung könnte das Ausmaß des Organversagens vermindern und den klinischen Verlauf der betroffenen Patienten verbessern. Um neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, ist ein detailliertes Verständnis der zugrundeliegenden, molekularen Mechanismen der Signaltransduktion, welche die Translokation von Gallensäuretransportern regulieren, notwendig.

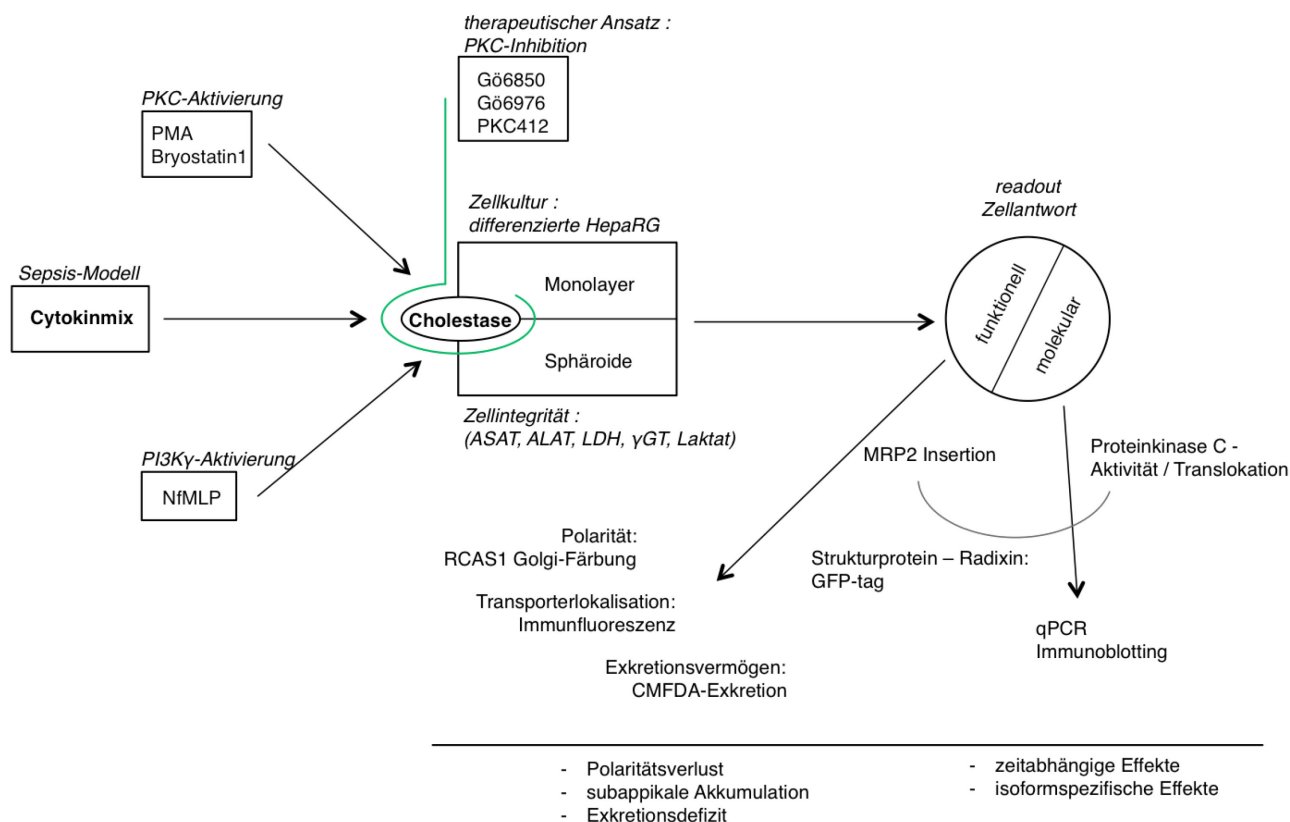
Exemplarisch soll die Beteiligung eines Schlüsselenzyms der Regulation der septischen Cholestase, die Proteinkinase-C, in einem etablierten Sepsis-Modell untersucht werden. Zu diesem Zweck werden ausgewählte PKC-Aktivatoren und Inhibitoren untersucht und ihr Einfluss auf die hepatische Dysfunktion durch die Messung paraklinischer Verlaufsparemeter in einem experimentellen Setting analysiert. Auf diese Weise kann ein besseres Verständnis der intrazellulären Signalkaskade, welche an der Translokation von MRP2 beteiligt ist, erreicht werden.

Vor diesem Hintergrund wurden folgende Hypothesen formuliert:

- Die Sepsis führt bereits in einer frühen Phase der Wirtsreaktion zu einer Cholestase einhergehend mit einem Verlust der hepatozytären Polarität.
- In der frühen Phase der Inflammation werden Proteinkinase-C-Isoformen aktiviert, die wesentlich an der Entwicklung einer septischen Cholestase beteiligt sind.
- Eine PKC-Aktivierung führt zu einem Funktionsverlust des MRP2/Radixin/F-Aktin-Komplexes und zu einer submembranären Translokation der Proteine.
- Die experimentelle PKC-Inhibition, analog zur klinisch-therapeutischen Maßnahme beim Menschen, kann die exkretorische Dysfunktion in der Frühphase der Sepsis lindern und die hepatozelluläre Integrität sichern.

Ziel der Arbeit ist es, an einem Sepsis-Modell *in vitro* die genannten Hypothesen zu untersuchen und Einblicke in die Pathomechanismen der frühen septischen Cholestase zu erlangen.

**Abbildung 6** gibt einen schematischen Überblick über das strategische Konzept der Arbeit.



**Abbildung 6: Strukturüberblick über das Studiendesign der vorliegenden Arbeit.**

In einer Leberzelllinie wird eine Inflammationsreaktion induziert, um die darauffolgenden Anpassungen der Gallensäuretransporter zu erfassen und den Nachweis zu erbringen, dass die Proteinkinase-C an den vermittelten Effekten beteiligt ist. Mit einer gezielten Aktivierung soll der Einfluss der Proteinkinase-C auf Polarität und Funktion von Hepatozyten untersucht werden. Weiter ist Ziel der vorliegenden Arbeit zu zeigen, dass mit der Anwendung unterschiedlicher PKC-Inhibitoren, als mögliche therapeutische Intervention, eine Verbesserung der septischen Cholestase erreicht werden kann. Zusätzlich zur konventionellen Zellkultur wurde eine 3D-Zellkultur (HepaRG-Sphäroide) als Modell etabliert, um die komplexe, dreidimensionale Gewebearchitektur und die Polarisierung des Leberparenchyms zu berücksichtigen. Um das Ausmaß der exkretorischen Dysfunktion bewerten und so Aussagen über eine aktive Beteiligung der Proteinkinase-C treffen zu können, wird die funktionelle Exkretionsleistung des Gallensäuretransporters MRP2 in den Hepatozyten analysiert und mit molekularen Nachweismethoden (qPCR, Immunhistochemie, subzelluläre Fraktionierung) kombiniert.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden einheitlich in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Brutschrank Hera Cell®, Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Die Zellen wurden zunächst in beschichteten Zellkulturflaschen (ZKF) mit Polymermodifikation (Oberfläche: 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup>, Greiner bio-one®, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert und für die Versuche jeweils in 6, 12 oder 24 Well Platten (Greiner bio-one®, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät.

##### 3.1.1 HepG2

HepG2-Zellen (#300198 CLS®, Eppelheim, Deutschland, ATCC® HB-8065) [68] wurden mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  / cm<sup>2</sup> ausgesät und in DMEM / Ham's F-12 Medium (#FG4815 Biochrom®, Berlin, Deutschland) mit fötalem Kälber Serum, Penicillin und Streptomycin (**Tabelle 1**) über zwei Wochen kultiviert. Eine Passagierung erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Für die Plasmidtransfektion wurden 100.000 HepG2-Zellen 24 Stunden vor Transfektion in Chamberslides mit einem 1,9 cm<sup>2</sup> großen Glasboden ohne Beschichtung (#627871 Greiner bio-one®, Frickenhausen, Deutschland) in 500 µl supplementärem Medium ausgesät.

10 %	Fötales Kälber Serum	#10270 gibco®, Massachusetts, USA
10 IU/µl	Penicillin	#15140-122 gibco®, Massachusetts, USA
10 µg/µl	Streptomycin	
2 mmol/l	GlutaMAX	#35050-038 gibco®, Massachusetts, USA
10 µg/ml	humanes Insulin	#I9278 Sigma Aldrich®, Steinheim, Deutschland
5 µmol/l	Hydrocortison hemisuccinat	#1319002 Sigma Aldrich®, Steinheim, Deutschland

**Tabelle 1: Mediumzusätze zur Kultivierung von Zellen.**

##### 3.1.2 HepaRG

HepaRG-Zellkulturen wurden freundlicherweise von Dr. Alexander Mosig zur Verfügung gestellt. Für die Kultivierung und Vermehrung wurden undifferenzierte adhärenente HepaRG-Zellen in einer Dichte von  $2,7 \times 10^4$  / cm<sup>2</sup> in Williams' Medium E (#F1115 Biochrom®, Berlin, Deutschland) mit fötalem Kälber Serum, Penicillin, Streptomycin, Glutamin, Insulin und Hydrocortison ausgesät (**Tabelle 1**). Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Nach 14 Tagen Kultivierung wurde mit einer Zugabe von 2% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, #4720.4 Roth®, Karlsruhe, Deutschland) zum Kulturmedium ein Wachstumsstopp initiiert.

Die Zugabe des DMSO erfolgte schrittweise und frisch bei jedem Mediumwechsel (1. Mediumwechsel 1% (v/v) DMSO, 2. Mediumwechsel 2% (v/v) DMSO). Die Zellen wurden im Anschluss für weitere zwei Wochen in Differenzierungsmedium mit 2% (v/v) DMSO kultiviert. Dabei erfolgte die Ausdifferenzierung der HepaRG-Zellen in einen epithelialen und hepatozyten-ähnlichen Zelltyp [69]. Für die Immunfluoreszenz wurden die HepaRG-Zellen auf runden Deckgläsern,  $\varnothing$  12mm (Menzel<sup>®</sup> GmbH, Braunschweig, Deutschland) in 24 Well Platten (500  $\mu$ l Medium pro Well) ausdifferenziert. Für die Lebendzellmikroskopie wurden die Zellen auf Chamberslides mit einem 1,9 cm<sup>2</sup> großen Glasboden (#627871 Greiner bio-one<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland) (500  $\mu$ l Medium pro Kammer) kultiviert.

#### 3.1.3 HepaRG-Sphäroide

HepaRG-Zellen wurden wie beschrieben (Kapitel 3.1) in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Nach der zweiwöchigen Wachstumsphase wurden die Zellen einmal mit 6 ml HBSS gewaschen und abtrypsiniert (1 ml 0,025% Trypsin/EDTA). Die ZKF wurde nun für 3 bis 5 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Klopfen mit der flachen Hand seitlich an die ZKF. Eine Sichtkontrolle mit dem Mikroskop war erforderlich. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert, um die Wirkung des Trypsins abzustoppen. Mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelte die Zellen. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50 ml Falcon (#227261 Greiner bio-one<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland) überführt und 4 Minuten bei 4°C und 400g zentrifugiert (Zentrifuge 5810 Eppendorf<sup>®</sup>, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Differenzierungsmedium resuspendiert und die Zellzahl durch Zählen nach Neubauer berechnet. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Differenzierungsmedium verdünnt, so dass 100  $\mu$ l Suspension 2000 HepaRG-Zellen enthielten. Schließlich wurden 20 Zellen/ $\mu$ l in 100  $\mu$ l Differenzierungsmedium in einer 96 Well Platte mit zellabweisender Oberfläche (#650970 Greiner bio-one<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät [70]. Alle 2 bis 3 Tage wurden 50  $\mu$ l des Differenzierungsmediums gewechselt.

#### 3.1.4 Stimulation

Vor Stimulationsbeginn wurden die HepaRG-Zellen zweimal mit *Hank's buffered Salt Solution* (HBSS, #L2945 Biochrom<sup>®</sup>, Berlin, Deutschland) gewaschen. Die Stimulation der Zellen erfolgte immer in frisch angesetztem Differenzierungsmedium.

**Tabelle 2** zeigt eine Übersicht über die verwendeten Stimulantien, ihre Konzentrationen und die Stimulationzeiträume. Die Stimulantien wurden in den entsprechenden Konzentrationen in frisch angesetzttem Medium auf die Zellen gegeben. Bei einer Kostimulation (PKC-Inhibition und PKC-Aktivierung) wurden die Zellen zunächst mit den höher konzentrierten PKC-Inhibitoren 30 Minuten präinkubiert. Nach Erreichen des Stimulationsendpunktes wurden die Zelllysate asserviert, die zu färbenden Zellen fixiert und die Zellüberstände in 0,5 ml Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland) gesichert und bei -80°C gelagert.

Stimulans	Endkonzentration	Stimulationszeitraum	Hersteller
PMA	100 nmol/l	6 / 16 Stunden	#1201 Tocris®
Bryostatın 1	100 nmol/l	6 / 16 Stunden	#2383 Tocris®
NfMLP	100 nmol/l	6 / 16 Stunden	#F3506 Sigma Aldrich®
Gö6850 / GF 109203X	200 nmol/l	6 / 16 Stunden	#0741 Tocris®
Gö6976	200 nmol/l	6 / 16 Stunden	#2253 Tocris®
PKC412	200 nmol/l	6 / 16 Stunden	#10459 Cayman Chemical Company®
AS605240	200 nmol/l	6 / 16 Stunden	#A0233 Sigma Aldrich®
Cytokinmix (LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ )	s.u.	6 / 16 Stunden	s.u.
Lipopolysaccharid E. Coli O111:B4	100 ng/ml	16 Stunden	#L2630 Sigma Aldrich®
rekombinantes humanes TNF- $\alpha$	50 ng/ml	16 Stunden	#Cyt-223 Prospec®
rekombinantes humanes IFN- $\gamma$	10 ng/ml	16 Stunden	#Cyt-206 Prospec®
rekombinantes humanes IL-1 $\beta$	10 ng/ml	16 Stunden	#Cyt-208 Prospec®
rekombinantes humanes IL-6	10 ng/ml	16 Stunden	#Cyt-213 Prospec®
Serum septischer Patient IL- 1 $\beta$ 7,05 pg/ml IL- 6 2282,75 pg/ml IL- 8 268,05 pg/ml IL-10 16,05 pg/ml	10%	16 Stunden	Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Jena

**Tabelle 2: Stimulantien und ihre Konzentrationen.** Die Stimulantien wurden entsprechend der Herstellerangaben nach Lieferung in DMSO, die Bestandteile des Cytokinmixes in sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert.

### 3.2 Genexpression

Für die Genexpressionsanalyse wurden HepaRG- und HepG2-Zellen auf 6 Well Platten kultiviert und wie im Detail beschrieben stimuliert. Alle Proben wurden in den nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritten identisch behandelt.

#### 3.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurde das RNeasy Mini Kit (QIAGEN® GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. HepaRG-Zellen wurden mit je 600 µl „RLT-Puffer“ lysiert. Dieser enthält Guanidium-Isothiocyanat und 1% β-Mercaptoethanol, das RNasen denaturiert [71]. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisierte das Lysat. Dieses wurde nun in vorgekühlte 2 ml Safe-Lock Tubes (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland) überführt. Um die Gefahr der RNA-Degeneration zu minimieren, fand die anschließende Verarbeitung ausschließlich auf Eis statt. Die totalRNA (totRNA) wurde anhand des vollautomatisierten QIAcube™ Protokolls (QIAGEN® GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend der Anweisungen des RNeasy Mini Kit-Herstellers separiert. Nach Zugabe von Ethanol kann die totRNA optimal an eine Silikat-Säulenmatrix binden. In mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten mit Waschpuffer „Buffer RW1“ und „Buffer RPE“ wurden Kontaminationen (Proteine / DNA / Kohlenhydrate) entfernt und die an die Matrix gebundene totRNA in 30 µl RNase-freies Wasser eluiert. Anschließend wurde die gewonnene totRNA für 5 min bei 60°C in einem Metallblock-Thermostat zur Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur inkubiert.

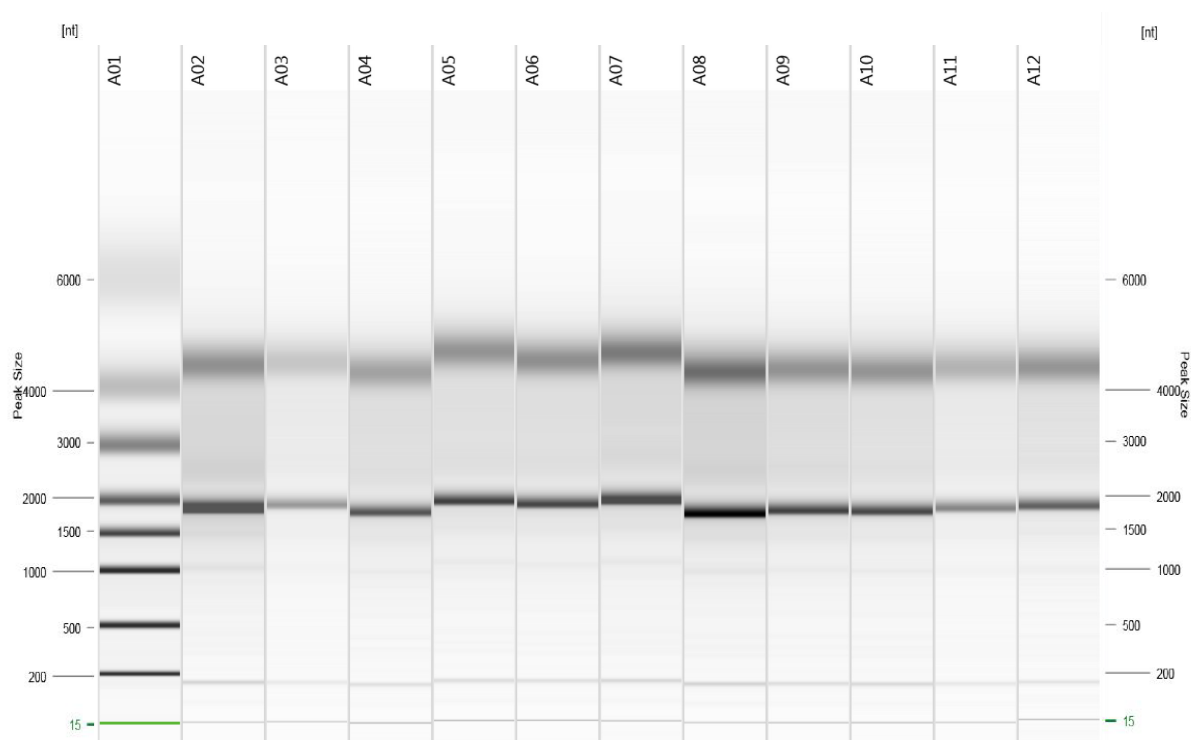
#### 3.2.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten totRNA erfolgte anhand des UV-Vis Spektrophotometers NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®, Massachusetts, USA) in 1 µl Eluat. Durch vorherrschende Oberflächenspannung bildet sich eine dünne Flüssigkeitssäule zwischen den beiden fiberoptischen Messpolen und ermöglicht den Lichtdurchtritt eines gepulsten Xenon-Lasers. Dieser ermittelt die optische Dichte bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Eine Extinktionskoeffizient von 1 wird einer Konzentration von 40 ng/µl RNA gleichgesetzt und so die RNA-Konzentration direkt berechnet. Weiterhin wurden die Quotienten 260nm / 280nm (Werte >2,0 sprechen für proteinfreie RNA) und 260nm / 230nm (optimale Werte zwischen 1,8 und 2,2 sprechen für geringe niedermolekulare Verunreinigung) erfasst.

Sämtliche Proben erfüllten o.g. Qualitätskriterien. Nach Vermessung am NanoDrop erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.3 RNA-Integrität

Die Integrität der verwendeten RNA kann die nachgeschalteten Untersuchungen beeinflussen. Die Beurteilung der RNA-Qualität stellt somit den ersten entscheidenden Schritt auf dem Weg zu einer validen Aussage über die Genexpression dar [72]. Das Verwenden von fragmentierter RNA mit niedriger Qualität kann erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Die Integrität der RNA übt messbaren Einfluss auf die Ergebnisse der Expression von Referenz- und Markergenen aus [73]. Die Integritätsprüfung der isolierten RNA erfolgte mithilfe des automatisierten Kapillarelektrophorese-Systems QIAxcel (QIAGEN® GmbH, Hilden, Deutschland). Die einzelnen Fraktionen der ribosomalen RNA (18S, 28S Untereinheiten) sowie fragmentierte RNA werden gemäß ihrer Größe aufgetrennt und in einem Elektropherogramm als digitales Bild visualisiert. Ein RNA Alignment-Marker dient zur Kalibrierung der Migrationszeit über alle Kanäle.



**Abbildung 7: Repräsentatives Elektropherogramm der isolierten RNA.** In Spalte A01 ist der Längenmarker mit definierter Nukleotidzahl (nt) zu sehen. In den Spalten A02 bis A12 zeigen sich repräsentative Bandenmuster von RNA-Proben; klar abgrenzbar sind 18S rRNA und 28S rRNA Banden. Zusätzlich erscheint schwächer ausgeprägt das Signal für 5S rRNA sowie ein Messgenauigkeitsindikator (grüner Strich).



Ein Photomultiplier-Detektor misst das Fluoreszenzsignal, während die Fragmente die Kapillare durchwandern. Die aufgetrennten Fragmente wurden mit einem Längenstandard (Size-Marker, 200-6000 nt) abgeglichen. Um die Sekundärstrukturen durch intra- bzw. intermolekulare Basenpaarungen auflösen zu können, wurden 1 µl Denaturierungspuffer mit 1 µl RNA gemischt und bei 70°C für 2 Minuten im Thermocycler Experion (Bio-Rad®, München, Deutschland) denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit RNA-Dilutionspuffer auf 10 µl aufgefüllt und im QIAxcel-Analysegerät mit Hilfe der Software QIAxcel ScreenGel 1.1.0 analysiert. Das Gerät prüft die RNA-Integrität anhand der Abgrenzbarkeit der ribosomalen 18S und 28S Banden. Bei zwei deutlich sichtbaren Banden und einem Quotienten (18S/28S-rRNA) von 0,7-2,5 geht man von einer guten Integrität der RNA Proben aus. Alle Proben erfüllten diese Qualitätskriterien und konnten für die Genexpressionsanalyse verwendet werden.

#### 3.2.4 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde nun zu komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) synthetisiert. Für diese reverse Transkription wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific®, Waltham, USA) verwendet. Hierfür wurden 1,0 µg RNA mit DEPC Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µl verdünnt. Präinkubiert wurde 5 Minuten bei 65°C mit 1 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> im ThermoCycler (Bio-Rad®, München, Deutschland) mit integrierter Deckelbeheizung im Programm *Main/Ferm65*. Anschließend wurde der Ansatz mindestens 2 Minuten auf 4°C abgekühlt. Dieser Vorgang bewirkt eine Denaturierung der RNA-Stränge und ermöglicht in der darauffolgenden Inkubation eine erleichterte Bindung der reversen Transkriptase (rT) an das mRNA-*Template*. Oligo (dT)<sub>18</sub> ist ein rT spezifischer Primer, der am 3'-Poly-A-Ende der mRNA ansetzt. Der Inkubationsmix, bestehend aus je 4 µl 5-fach Reaktionspuffer, 2 µl dNTP (10mmol/L), 1 µl des RiboLock RNase Inhibitors (20U/µl) und Revert Aid RT (200U/µl) wurde für alle Proben eines cDNA-Synthese Durchganges vorgemischt und mit einem Volumen von je 8,0 µl unter Resuspendierung in die Sampletubes eingebracht (Gesamtvolumen 20 µl). Anschließend folgte die Inkubation im Programm *Main/FermRT* im ThermoCycler (Bio-Rad®, München, Deutschland). Die Proben durchlaufen dabei die Schritte 60 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 70°C und 2 Minuten bei 4°C. Während der Inkubation bei 42°C synthetisiert die rT einen basenkomplementären Tochterstrang aus dNTPs. Die RNA-Matrize wird durch die Aktivität der Ribonuclease H zu Oligonukleotiden abgebaut.

Der beigefügte RNase-Inhibitor schützt die RNA vor dem Abbau durch Ribonucleasen unter 50°C. Bei 70°C erfolgt dann die Deaktivierung der rT. Nun lagen cDNA-Proben mit einer Konzentration von 50 ng/µl vor. Für die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wird eine Konzentration von 5 ng/µl benötigt. Der inkubierte Ansatz wurde mit 180 µl DEPC-Wasser auf 200 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 3.2.5 quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) ist eine sensitive molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren und gleichzeitigen Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit. Die hier verwendete Methode basiert auf der Bindung der fluoreszierenden Substanz BRYT Green® (Promega®, Madison, USA) an doppelsträngige DNA (dsDNA). Der Farbstoff interkaliert mit der DNA und signalisiert während der PCR-Zyklen eine Bindung mit stärkerer Fluoreszenz, deren Intensität direkt mit der Menge an PCR-Produkten korreliert und eine quantitative Beurteilung erlaubt.

#### 3.2.6 Primer

Gen	<i>forward</i> Primer (5' → 3')	<i>reverse</i> Primer (3' → 5')	bp	k T <sub>m</sub> (°C)	g T <sub>m</sub> (°C)
<i>h_HMBS</i>	ATGTCTGGTAACGGCAATGC	CGTCTGTATGCGAGCAAGC	105	81,4	82,4
<i>h_HPRT</i>	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	AGACGTTCAAGTCCTGTCCATAA	131	79,6	79,7
<i>h_GAPDH</i>	CTCTGCTCCTCTGTTTCGAC	CAATACGACCAATCCGTTGAC	116	81,5	86,2
<i>h_PKCA</i>	CGAGGAAGGAAACATGGAACCTCAG	CCTGTCGGCAAGCATCACCTTT	193	81,6	84,7
<i>h_PKCB1/2</i>	AGAGACAAGAGAGACACCTCCAAC	GAATTGATACATACGCTTGGCTTG	218	79,9	* 84,7
<i>h_PKCB2</i>	ATAGCAGCGATGTGGTCAGG	GCAAGTCTCACCAGGGAACA	246	81,1	* 82,2
<i>h_PKCG</i>	TGACGAAACAGAAGACCCGAAC	CTCATACAATTCCAGGGGGTAGTT	320	81,4	* 82,5
<i>h_PKCD</i>	GCATCGCCTTCAACTCCTATGAGCT	ACACACCCACGGTCACCTCAGA	249	87,7	88,5
<i>h_PKCE</i>	TGCCCCACAAGTTCCGGTATC	GCCGCTGTTGGTGATTTGT	230	83,7	87,1
<i>h_PKCH</i>	GTCTACCCTACCTGGCTCCA	ATTCTGGGTCTGAAAGGCGG	191	84,0	86,3
<i>h_PKCQ</i>	AGTTCGACCTTTCCAGAGCG	TCTCTGGGGCGATGTAGTCA	225	82,8	83,0
<i>h_PKCZ</i>	TAATCAGAGTCATCGGGCGC	ACTTGTCGTCTGGAAGCAGG	212	84,5	85,6
<i>h_PKCI</i>	CCACACTTTCCAAGCCAAGC	ATGGGCATCACTGGTTCCTG	189	83,5	84,8
<i>h_PKD1</i>	TCCCCACGCTCTCTTTGTTC	TCACACCGCTGCAATTGTTG	164	81,4	82,8
<i>h_MRP2</i>	TGCAGCCTCCATAACCATGAG	CTTCGTCTTCCTTCAGGCTATTCA	140	82,4	83,2

**Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer und die Gennamen der untersuchten Transkripte.** bp = Länge des Templates in Basenpaaren angegeben; k T<sub>m</sub> = kalkulierte Schmelztemperatur; g T<sub>m</sub> = gemessene Schmelztemperatur. \* Die Schmelzkurvenanalyse dieser Primer erfolgte in Proben von humanem Cerebrum, die freundlicherweise von der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt wurde.

Um die spezifische Bindung der verwendeten Primer an ihre Transkripte zu gewährleisten wurden entweder für selbigen Gebrauch in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Primer benutzt oder wie folgt *de novo* gestaltet.

Die Transkriptsequenzen inklusive *splicing*-Varianten wurden unter Verwendung der HGNC-Genbezeichnung auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> ermittelt. Anschließend wurde die Transkriptsequenz im FASTA-Format verwendet, um mittels der Onlinesoftware *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) und *Primer 3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) geeignete, exoneinspannende Primer zu ermitteln. Als Kriterien galten hierbei u.a. eine optimale Länge von 18-22 Basenpaaren, Schmelztemperatur von 57°C bis 62°C, ein GC-Gehalt von 40-60% und eine geringe Inzidenz von Sekundärstrukturen. Zuvor wurden ggf. *splicing*-Varianten mittels *multiple-alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) auf Schnittmengensequenzen untersucht. Anschließend wurden die ermittelten Primer auf deren Schmelztemperatur getestet (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), im *Oligo Analyzer* (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) auf die Bildung etwaiger intermolekularer Sekundärstrukturen und *hairpin*-Bildung untersucht und ggf. verworfen. Die als geeignet bewerteten Primer wurden anschließend bei biomers.net (Ulm, Deutschland) im Auftrag synthetisiert. Die Primer wurden nach Lieferung gemäß dem Herstellerprotokoll mit RNase-freiem Wasser auf 100 pmol/l verdünnt, bevor je 20 µl des *forward* und *reverse* Primers mit 960 µl DEPC-Wasser zum sog. *Primerstock* (2 pmol/l *fwd* und *rev*) verdünnt und bei -20°C gelagert wurden.

#### 3.2.7 PCR-Ansatz

In der vorliegenden Arbeit wurde der GoTaq® qPCR Master Mix (#A6002 Promega®, Madison, USA) für die Genexpressionsanalyse verwendet. Der komplette Reaktionsansatz bestand aus 10 µl GoTaq® Master Mix, 5 µl Primerstock - Lösung (2 pmol/l forward, 2 pmol/l reverse) 5 µl der *sample*-cDNA (5 ng/µl). Das Liquid Handling der einzelnen PCR-Ansätze erfolgte mittels des Pipettierroboters Corbett CAS-1200 (Qiagen®, Hilden, Deutschland) und der Software CAS Robotics 4.9.1 (QIAGEN® GmbH, Hilden, Deutschland). Im GoTaq® Master Mix befinden sich bereits alle für die PCR notwendigen Reagenzien, Puffer, MgCl<sub>2</sub>, Nukleotide, Taq-Polymerase, BRYT Green® und Stabilisierungsreagenz. Direkt nach dem Pipettieren erfolgte die qRT-PCR der Ansätze im Cyclet Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen®, Hilden, Deutschland).

### 3.2.8 2 Step PCR-Protokoll:

1. Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase: 95°C, 2 Minuten
2. Denaturation : 92°C, 15 Sekunden
3. Annealing/Extension : 60°C, 60 Sekunden
4. 40 Zyklen der Schritte 2.-4.
5. Schmelzkurvenanalyse: Anstieg von 72°C auf 95°C in 0,5°C Intervallen alle 3 Sekunden

### 3.2.9 C<sub>t</sub>-Wert Bestimmung und Schmelzkurvenanalyse

Als Maß für die Quantifizierung wurde der Wert des sog. *threshold cycle* herangezogen [74]. Der Zyklus (*cycle*) in der exponentiellen Phase, bei dem das Fluoreszenzsignal einen Grenzwert (*threshold*) überschreitet, wird als *threshold cycle* (C<sub>t</sub>-Wert) bezeichnet. In dieser Arbeit wurde der *threshold* einheitlich auf  $10^{-1}$  (*normalized fluorescence*) festgelegt. Bei idealer Primereffizienz (2,0) kann man in jedem PCR-Zyklus annähernd eine Verdopplung der PCR-Produktmenge bzw. einen proportionalen Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachten. Ein um eine Einheit geringerer C<sub>t</sub>-Wert entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA, respektive mRNA. Deshalb erlauben die gemessenen C<sub>t</sub>-Werte Rückschlüsse über die Ausgangsmenge des untersuchten Transkriptes im PCR Ansatz. Weiterhin wurde bei den PCR Läufen die Bildungsrate unspezifischer PCR-Produkte anhand der Schmelzkurvenanalyse untersucht. Hierbei wird nach der Amplifikationsphase die Temperatur schrittweise von 72°C auf 95°C erhöht, bis das gebildete PCR-Produkt bei der Schmelztemperatur denaturiert, die DNA in zwei Stränge zerfällt und den interkalierten Fluoreszenzfarbstoffes BRYT Green<sup>®</sup> freilässt, was dessen Fluoreszenzsignal schlagartig mindert. Doppelsträngige DNA der PCR-Produkte hat einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische Primerdimere. Hierüber und über die Übereinstimmung der Schmelzkurven in verschiedenen, unabhängigen Proben und auch *in silico*, aufgrund der Nukleotidzusammensetzung berechnet, konnte unter den gewählten Bedingungen die Spezifität der PCR-Reaktionen hinreichend genau beurteilt werden. In der vorliegenden Arbeit zeigten die PCR-Produkte stets nur einen (einheitlichen) Peak in der Schmelzkurvenanalyse, der im Vergleich zur theoretischen Schmelztemperatur nur gering abwich (siehe **Tabelle 3**). Die Amplifikation unspezifischer PCR Produkte konnte als vernachlässigbar eingestuft werden. Auf eine Sequenzierung wurde verzichtet.

### 3.2.10 Primereffizienz

Die Primereffizienzen wurden für die Berechnung bei der relativen Quantifizierung benötigt und befähigten weiterhin zur Aussage über die Primerqualität. Die Ermittlung dieser erfolgte durch die Software Comparative Quantitation (QIAGEN® GmbH, Hilden, Deutschland) [75].

### 3.2.11 Relative Quantifizierung

Um anhand der ermittelten  $C_t$ -Werte das Maß der Genexpression auszudrücken, bedient man sich der relativen Quantifizierung mit unterschiedlichen bonafide stabilen Transkripten. Neben den  $C_t$ -Werten und der Primereffizienz fließen zusätzlich die  $C_t$ -Werte von Referenztranskripten, sog. Housekeepern, in die Berechnungsmethode nach Pfaffl [76] mit ein. Als solche bezeichnet man Gene, die für die Aufrechterhaltung der grundlegenden Zellfunktionen zuständig sind und nur einer geringen Regulation unterliegen sollten. Sie stellen somit einen geeigneten Referenzwert für die relative Quantifizierung dar [77]. Für die Ermittlung eines geeigneten Referenztranskripts wurden drei Referenztranskripte ausgewählt, deren Expression beim Menschen als konstant gilt. Die Überprüfung dieser Expressionsstabilität erfolgte anhand der Microsoft Excel® Implementation Normfinder nach Instruktionen des Entwicklers (<http://moma.dk/files/Normfinder%20documentation-v20.pdf>). Von den drei getesteten Transkripten HMBS (Stabilitätswert: 0,016), HPRT (Stabilitätswert: 0,067), GAPDH (Stabilitätswert: 0,217) zeigte HMBS die geringsten Schwankungen in allen untersuchten Proben und wurde deshalb als Referenztranskript für die weiteren Berechnungen gewählt. Anhand dieser Formel wird die Expressionsveränderung als Verhältnis (ratio) von einem Zielgen (target) zu einem Housekeeping-Gen (ref) betrachtet.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Im Zähler wird die Primereffizienz ( $E_{\text{target}}$ ) mit der Differenz der  $C_t$ -Werte aus unbehandelter (control) und behandelter (sample) Probe potenziert. Im Nenner wird die Primereffizienz ( $E_{\text{ref}}$ ) des gewählten Referenztranskripts HMBS mit der Differenz der  $C_t$ -Werte (HMBS) der unbehandelten (control) und behandelten (sample) Probe potenziert. Die ratio wurden anschließend log2-transformiert, so dass eine Herauf- oder Herabregulation um  $\Delta 1$  einer Verdopplung bzw. Halbierung an eingesetzter cDNA respektive mRNA bedeutet. Auf diese Weise ist eine Darstellung mit äquidistanten Skalenniveaus möglich [76]. In allen Abbildungen werden diese transformierten Werte als log2 *fold change* bezeichnet.

#### 3.2.12 Erstellung eines Genexpressionsprofils

Für die Erstellung eines Genexpressionsprofils wurden als Bezugsgröße aus unstimulierten Proben die  $C_t$ -Werte für das jeweilige *Gene of Interest* bestimmt ( $n \geq 4$ ).

(in der Formel:  $C_t$  GOI: Gene of Interest =  $C_t$  Wert des untersuchten Gens in der Probe)

Die Wasserkontrolle in einer qPCR enthält lediglich  $H_2O$  sowie den jeweiligen *forward* und *reverse* Primer und wurde als letzte Probe aus dem Reaktionsmix pipettiert. Der aus dieser Probe bestimmte  $C_t$ -Wert zeigt den Zyklus an, ab dem unspezifisch gebildete Primer-Dimere die Fluoreszenzgrenze (*threshold*:  $10^{-1}$ ) erreichen oder aufgrund einer *template* Verschleppung unrichtige Signale erhalten werden.

(in der Formel:  $C_t$  NTC =  $C_t$  Wert der Wasserkontrolle / *No Template Control*).

Die Primer der untersuchten Gene bildeten in der Wasserkontrolle innerhalb von 40 PCR-Zyklen unspezifisch Dimere ( $C_t$ -Werte  $\leq 40$ ). Von diesem hohen, für die jeweiligen Primer spezifischen  $C_t$ -Wert wurde der  $C_t$ -Werte der Probe abgezogen.

Dieser positive Wert wurde schließlich mit einem *Housekeeper*-Index (in der Formel: HK-Index) aus den drei Referenztranskripten HMBS, GAPDH und HPRT normalisiert. Für das Genexpressionsprofil wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Arbitrary Unit (AU)} = (C_t \text{ NTC} - C_t \text{ GOI}) \times \text{HK} - \text{Index}$$

Diese Berechnung ermöglichte es, anders als bei der Methode nach Pfaffl, die Expression der analysierten Gene im Verhältnis zueinander und nicht nur im Verhältnis zum jeweiligen Referenztranskript zu betrachten. Je intensiver ein Transkript auch unter Kontrollbedingungen exprimiert wird, desto früher erscheint es auch vor der Wasserprobe.

War der  $C_t$ -Wert der Wasserkontrolle kleiner als der der Probe, konnte davon ausgegangen werden, dass sich das gesuchte Gen nicht in der Probe befand (Die Berechnung mit der oben gezeigten Formel ergab in diesem Fall negative Werte, die nicht in die Darstellung mit einfließen).

### 3.3 Immunoblotting

Der Immunoblot ist eine Technik zur Identifizierung eines Proteins aus einem heterogenen Proteinextrakt mit Hilfe spezifischer Antikörper, die an Epitope auf dem nachzuweisenden Protein binden. Die erhaltenen Informationen geben Auskunft über Molekulargewicht, Expression des Zielproteins sowie dessen relative Quantität.

#### 3.3.1 Zellyse

Adhärenzte HepaRG-Zellen wurden nach Stimulation für den Proteinnachweis lysiert. Die 6-Well Zellkulturplatte wurde auf Eis gestellt und mit HBSS gewaschen. Dann wurde auf die Zellen 150 µl Radioimmunoprecipitation Assay Puffer (RIPA; 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 1% Natriumdesoxycholat, 0.1% SDS, 1 mmol/l EDTA, 1% Phosphatase-Inhibitor, 1% Protease-Inhibitor) gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgekratzt und behutsam in ein vorgekühltes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis. Das Lysat wurde dann bei 4°C für 10 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und bei -80°C asserviert, das Zellpellet verworfen.

#### 3.3.2 Proteinkonzentrationsmessung mittels Bicinchoninsäure

Für die Messung der Proteinkonzentration in den Proben wurde der colorimetrische BCA-Assay verwendet. Die Methode beruht auf einer stöchiometrischen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteinbindungen.  $\text{Cu}^+$  bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violett gefärbten Chelat-Komplex, der bei 550 nm photometrisch detektiert werden kann [78]. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration diente eine Kalibrationsgerade, die mit definierten Mengen eines Proteinstandards (BSA) in absteigender Konzentration von 1000 µg/ml bis 0 µg/ml hergestellt wurde. Über eine lineare Regression ließen sich die entsprechenden Proteinkonzentrationen der Proben berechnen, der Regressionskoeffizient betrug stets 0,99. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:2, 1:5 und 1:10 mit dem Proteinlysepuffer verdünnt. Somit erfolgte eine Dreifachbestimmung für die Standardreihe bzw. die Proben. Für die photometrische Messung wurden 25 µl verdünntes Proteinlysate mit 200 µl der BCA-Reagenz (1 Teil Färbelösung, 50 Teile BCA-Puffer) verdünnt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei 550 nm als Doppelbestimmung vermessen (alle Werte > 1,5). Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration.

### 3.3.3 Fraktionierung

Um Aussagen über eine Verteilung der Proteinkinasen innerhalb der Zelle treffen zu können, wurde mittels Ultrazentrifugation das gewonnene HepaRG-Zelllysate in eine cytoplasmatische und eine mikrosomale Fraktion aufgetrennt. Sämtliche Verfahren wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem HBSS gewaschen und in 100 µl Lysepuffer (330 mmol/l Saccharose, 20 mmol/l Tris, 2 mmol/l EDTA, 2 mmol/l EGTA, 2 mmol/l DTT, 1 mmol/l PMSF, 1% Phosphatase-Inhibitor, 1% Protease-Inhibitor) aufgenommen und mit 2 Impulsen eines 20 % Ultraschallhomogenisators mechanisch lysiert. Nun wurde das Lysat in einer Beckman Coulter Optima TLX-120 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter®, Brea, USA) 30 Minuten bei 4 °C und 100.000 g ultrazentrifugiert. Der Überstand, der die cytosolische Fraktion enthielt, wurde abgenommen und bei -80°C asserviert. Um verbliebene cytoplasmatische Proteine auszuwaschen, wurde das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Waschfraktion verworfen. Das Pellet wurde nun in 100µl Lysepuffer mit 1% Triton X-100 resuspendiert und mit 25 Impulsen beschallt (20%). Nach 10 minütiger Inkubation wurde erneut 30 Minuten bei 4°C und 100.000 ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als mikrosomale Fraktion bei -80°C asserviert. Die Proteinkonzentration in den jeweiligen Fraktionen wurde mittels Bradford Reagenz (#B6916 Sigma Aldrich®, Steinheim, Deutschland) bei 595 nm bestimmt [79].

### 3.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung und Analyse von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dazu wurden 25 µg Protein mit 2x SDS Sample Buffer (#43401.C SERVA®, Heidelberg, Deutschland) und 5% β-Mercaptoethanol (#M3148 Sigma Aldrich®, Steinheim, Deutschland) gemischt. Zu jeder Probe wurden 5 µl *Lightning Red* (#43401 SERVA®, Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben. Es folgte kurzes vortexen und zentrifugieren. Das SERVAGel™ Neutral HSE (# 43245 SERVA®, Heidelberg, Deutschland) wurde in die mit Laemmli Buffer (#42556 SERVA®, Heidelberg, Deutschland) gefüllte Gelelektrophoresekammer gesteckt. Die Trenneigenschaften des Gels führen zu einer Auftrennung der Banden im Bereich von ca. 5 - 100 kDa. Jeweils 15 µl Probe wurde in eine Lasche des Gels pipettiert. 3 µl Pink Color Protein Standard II (#39259 SERVA®, Heidelberg, Deutschland) dienten als Leiter. Nun wurde für 15 Minuten eine Stromstärke von 10 mA, gefolgt von 75 Minuten bei 20 mA angelegt.



### 3.3.5 Proteintransfer und Proteindetektion

Im Nassblotverfahren wurden die im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid Membran (PVDF) transferiert. Das Gel wurde auf Filterpapier platziert und in der *Blotting*-Vorrichtung auf drei *Blotting-Pads* gelegt. Im nächsten Schritt wurde auf das Gel die Membran, ein weiteres Filterpapier und drei weitere *Blotting-Pads* hinzugefügt. Der Elektrotransfer wurde bei 45 mA für 45 Minuten durchgeführt. Zur Kontrolle der Genauigkeit und Qualität des Proteintransfers, wurden die Membran an einem Blaulicht-Leuchttisch (470 nm, BlueLight Table SERVA) angesehen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die PVDF-Membran nun 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit Blockierlösung (TBS-Tween 0,01 mol/l Tris, 0,1 mol/l NaCl, 0,1% Tween 20, 5% BSA) unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach Abgießen der Lösung, wurde die Membran mit dem primären Antikörper (**Tabelle 4**) über Nacht bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-Tween für 15 Minuten gewaschen. Darauf folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers *Anti-rabbit* IgG (0,01%, # 711-035-152 Jackson ImmunoResearch®, Baltimore, USA) der nun für 1 Stunde unter ständigem Schwenken bei RT inkubierte. Es folgten erneut drei Waschgänge mit TBS-Tween über 15 Minuten. Nach Entfernung des TBS-Tween wurde zur Detektion des sekundären Antikörpers auf die Membran 500 µl SERVALight Peroxide Solution Reagent A (#42585.A SERVA®, Heidelberg, Deutschland) sowie 500 µl SERVALight Peroxide Solution Reagent B (#42585.B SERVA®, Heidelberg, Deutschland) pipettiert und bei RT inkubiert. Nach Ablauf der 5-minütigen Inkubationszeit wurde die Lösung entfernt und die Membran in Folie eingewickelt. Die Chemilumineszenz wurde mithilfe des ImageQuant LAS4000 (FujiFilm, Japan) bestimmt und mittels CCD Kamera dokumentiert (Geräteinstellung: *Tray 1, Exposure Type: Precision, Exposure time: Auto, Sensitivity: Standard*).

## 3.4 Klinische Chemie

### 3.4.1 Bestimmung von ALAT, ASAT, LDH, $\gamma$ GT und Laktat

Die Messung von paraklinischen Verlaufsparemtern, welche die Organfunktion der Leber reflektieren, erfolgte aus dem asservierten Überstand (-80°C) der stimulierten HepaRG-Zellen. Sie wurde in Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Universitätsklinikum Jena mit dem Architect ci8200 (Abbott Laboratories®, Illinois, USA) photometrisch, potentiometrisch oder turbidimetrisch durchgeführt.

### 3.5 Immunfluoreszenz

Um spezifische Proteinstrukturen und ihre Lokalisation nachzuweisen und darzustellen, wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewandt.

#### 3.5.1 Einbettung und Färbung der HepRG-Sphäroide

Nach der zweiwöchigen Differenzierungsphase und ggf. Stimulation wurden die Sphäroide fixiert und eingebettet. Dazu wurden jeweils 10 Sphäroide mit Medium in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland) gepoolt. Innerhalb der nächsten 5 Minuten sanken die Sphäroide an die untere Spitze des Gefäßes und das Medium konnte unter Sichtkontrolle vorsichtig abpipettiert werden. Nun wurde 500 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) dazugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das 4% PFA abgesaugt und ein Tropfen 1% *UltraPure™* Agarose (#16500100 invitrogen®, Carlsbad, Kalifornien, USA) hinzugegeben. Nun konnten die Sphäroide eingedeckt werden. Die erkaltete Agarose wurde mit einem Spatel aus dem Mikroreaktionsgefäß geborgen und in 4 x 2 x 0,5 cm Kunststoffkassetten (Roth®, Karlsruhe, Deutschland) eingelegt. Die Lagerung, bis zur anschließenden Entwässerung, erfolgte in 70% Alkohol. Dafür wurden die Kassetten in den Gewebeeinbettautomaten Histokinette Leica TP 1020 (Leica Biosystems®, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt. Hierbei durchliefen alle Proben eine aufsteigende Alkoholreihe: 2 x 1,5 Stunden in 70%, 2 x 1,5 Stunden 96%, 3 x 1,5 Stunden 99% Ethanol, 1 x 1,5 Stunden Gemisch 99% Ethanol und Xylol zu gleichen Teilen, 2 x 1,5 Stunden Xylol, 2 x 1,5 Stunden flüssiges Paraffin bei 60°C. Anschließend wurden die Proben mit einer Pinzette entnommen, in einem Metallförmchen mit heißem Paraffin (60°C) übergossen und zum Festigen auf einer -5°C kalten Kühlplatte gelagert. Die gesamte Einbettung erfolgte anhand der Paraffinausgießstation Leica EG1160 (Leica Biosystems®, Wetzlar, Deutschland). Die paraffineingebetteten Proben konnten bei RT lichtgeschützt gelagert werden, wurden aber vor Einsatz im Mikrotom etwa 1 Stunde vor Gebrauch bei -20°C ausgehärtet. Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte unter Verwendung des Rotationsmikrotoms Leica RM 2165 (Leica Biosystems®, Wetzlar, Deutschland). Als geringste realisierbare Schnittdicke konnten 3 µm gewählt werden. Die hergestellten Schnitte wurden in destilliertem Wasser erst bei RT, dann bei 40°C schwimmend gestreckt, auf dem Objektträger (OT) positioniert und 16 Stunden bei 37°C im Trockenschrank Heraeus UT6060 (Kendro Laboratory Products®, Langenselbold, Deutschland) lichtgeschützt getrocknet.

### 3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert: 10 Minuten in Xylol, 5 Minuten in 99% Ethanol und Xylol zu gleichen Teilen, je 2 Minuten in Ethanol 99%, 96%, 70%, 50% und anschließend unter laufendem destilliertem Wasser für 2 Minuten. Die OT wurden nun 5 Minuten mit Hämatoxylin nach P. Mayer eingedeckt. Dann wurden die Schnitte 5 Minuten mit Leitungswasser gebläut und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Nun wurde 5 Minuten mit Eosin gefärbt und daraufhin so lange mit destilliertem Wasser in der Küvette gewaschen, bis keine Farbwolken mehr entstanden. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe, je 1 Minute 50%, 70%, 96%, 99% Ethanol, 99% Ethanol und Xylol zu gleichen Teilen, Xylol. Der OT wurde nun mit Entellan (# 107960 Merck® KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

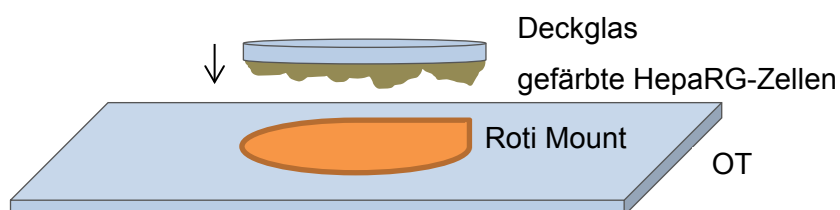
### 3.5.3 Vorbereitung der Sphäroide für die Immunfluoreszenz

Die OT mit den Sphäroiden wurden in einer absteigend Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mittels Citratpuffer pH 6,1 (#S1699 Dako®, Hamburg, Deutschland) unter 20-minütigem Erhitzen auf 97°C demaskiert. Die Immunfluoreszenzfärbung ist im folgenden Kapitel beschrieben.

### 3.5.4 Färbung von HepaRG-Zellen

Das Medium wurde abpipettiert, zentrifugiert (8000 g, 4 Minuten, 4°C) und bei -80°C asserviert. Die Zellen wurden nun zweimal mit HBSS gewaschen. Es folgt eine Fixierung für 15 Minuten bei RT mit 4% PFA. Die Zellen wurden nun zweimal mit Waschpuffer (WP, Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS), 0.1% Bovines Serum Albumin (BSA)) gewaschen (200 µl pro Well). Es folgte die Permeabilisierung in Permeabilisierungspuffer (TBS, 0.5% Triton-X100) für 30 Minuten bei RT (200 µl pro Well) und darauffolgend zweimaliges Waschen mit WP. Nun wurde die Permeabilisierung mit Blockierungspuffer beendet (BP, 1xTBS, 10% BSA, 200 µl pro Well). Dieser besetzt die unspezifischen Bindungsstellen. Nach 1 Stunde bei RT wurde der BP abgesaugt, die Zellen jedoch nicht gewaschen. Nun wurde der primäre Antikörper, in BP verdünnt (**Tabelle 4**), hinzugegeben (2 Stunden bei RT, 100 µl pro Well). Um die einzelnen Wells vor Austrocknung zu schützen, wurde die 24 Wellplatte mit Parafilm überzogen. Es folgten zwei Waschschrte mit WP. Von nun an wurde lichtgeschützt gearbeitet.

Der sekundäre Antikörper wurde gemeinsam mit AF<sup>®</sup> 647 Phalloidin (F-Aktin Färbung) in Antibody Diluent (#S3022 Dako<sup>®</sup>, Hamburg, Deutschland) verdünnt (**Tabelle 5**). Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei RT mit Parafilm überzogen und in dunkler, feuchter Atmosphäre (100 µl pro Well). Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten zwei Waschschrte mit WP sowie zwei Waschschrte mit destilliertem Wasser. Auf die vorbereiteten Polylysin beschichteten Objektträger (#J2800AMNZ Menzel<sup>®</sup> GmbH, Braunschweig) wurde ein Tropfen Roti-Mount FluorCare DAPI (#HP20.1 Roth<sup>®</sup>, Deutschland) pro einzudeckendes Deckglas getropft. Roti-Mount ist ein wasserlösliches Einschlussmittel mit Ausbleichschutz für Fluoreszenzfarbstoffe und gleichzeitiger Kerngegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch die Bindung an DNA stark-fluoreszierende Farbkomplexe bildet. Die Deckgläser wurden nun mit einer Pinzette und feiner Nadel aus der Vertiefung der 24 Wellplatte entnommen und mit der Zelloberfläche nach unten in den Tropfen Eindeckmedium auf den OT gelegt (**Abbildung 8**). Die OT wurden nun zur Aushärtung lichtgeschützt bei 4°C getrocknet.



**Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der angefertigten Objektträger.** Das Deckglas mit den Zellen wurde mit leichtem Druck auf den OT aufgetragen. Überschüssiges Roti Mount wurde entfernt.

**Tabelle 4** und **Tabelle 5** stellen eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper dar.

primäre Antikörper	host	Verdünnung	Hersteller
MRP2	rabbit	1:100	#M8316 Sigma-Aldrich®
Radixin	rabbit	1:100	#R3653 Sigma-Aldrich®
RCAS1 (D-9)	mouse	1:100	#sc-398052 Santa Cruz®
PKC $\alpha$	rabbit	1:100	#PA5-17551 Thermo Fisher®
PKC $\zeta$	rabbit	1:100	#PA5-29337 Thermo Fisher®
GAPDH	rabbit	1:200	#sc-25778 Santa Cruz
Calnexin	rabbit	1:1600	#ab22595 Abcam

**Tabelle 4: Primäre Antikörper.** Übersicht über die verwendeten Antikörper, deren Verdünnung und Hersteller mit Produktnummer.

sekundäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 568, anti-rabbit	1:500	#A-11036 Thermo Fisher®
Alexa Fluor® 488, anti-mouse	1:500	#ab150117 abcam®
Alexa Fluor® 647 Phalloidin, F-Aktin	1:40	#A-22287 Thermo Fisher®

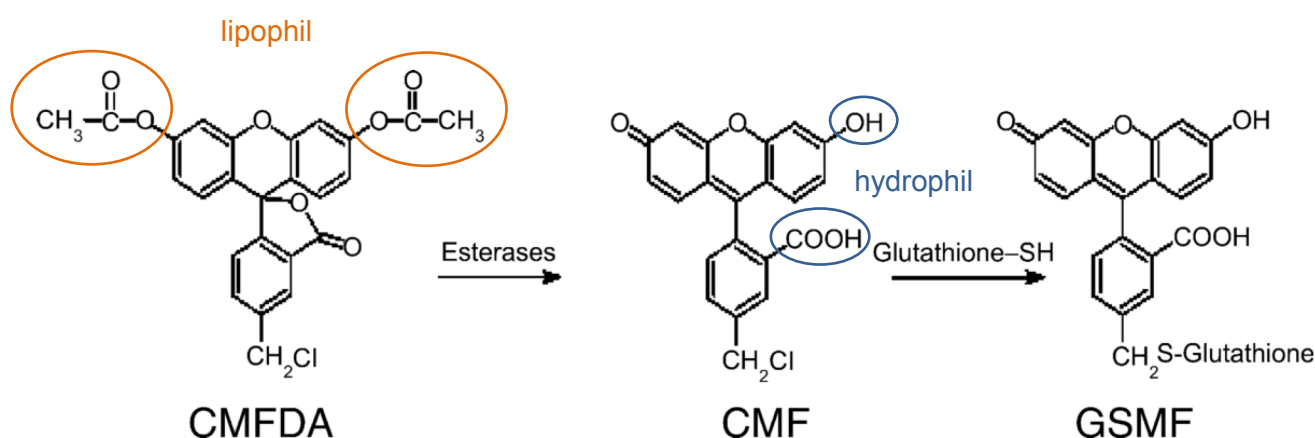
**Tabelle 5: Sekundäre Antikörper.** Übersicht über die verwendeten Antikörper, deren Verdünnung und Hersteller mit Produktnummern.

### 3.6 Lebendzellmikroskopie

Die Lebendzellmikroskopie ist eine Methode, bei der funktionelle Aspekte und fortlaufende Prozesse von lebenden Zellen betrachtet, dokumentiert und ausgewertet werden können.

#### 3.6.1 5-Chloromethylfluorescein-diacetat

5-Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA #ab145459 abcam®, Cambridge, Großbritannien) ist ein nicht-fluoreszierendes, lipophiles Fluoreszeinderivat, dass die Zellmembran leicht durchdringt. Innerhalb der Zelle wird es von unspezifischen Esterasen zu fluoreszierendem 5-Chloromethylfluorescein (CMF) umgewandelt. CMF ist aufgrund der Carboxygruppe und des tautomeren Systems hydrophil und kann daher die Zellmembran nur schwer überwinden. In einem zweiten Schritt reagiert die Chloromethylgruppe mit intrazellulärem Glutathion und formt Glutathion-Methylfluorescein (GSMF). GSMF ist ein Substrat von MRP2 (**Abbildung 9**) [80].

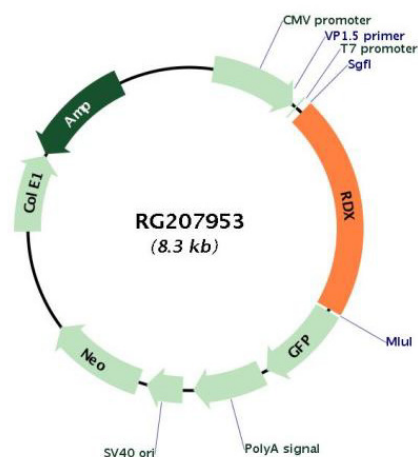


**Abbildung 9: Strukturformeln und Reaktion von CMFDA, CMF, GSMF.** Darstellung adaptiert aus: Förster, F. et al. *Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008 [80].

HepaRG-Zellen wurden in den Wells stimuliert und nach Ablauf des Stimulationszeitraumes für die Lebendzellmikroskopie vorbereitet. Dafür zur Verfügung stand ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM780, Carl Zeiss® GmbH, Göttingen, Deutschland) mit integriertem Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Das Stimulationsmedium wurde abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nun wurde die Zellkulturschale in den Inkubator des Mikroskops gelegt und CMFDA (1 µmol/l) hinzugegeben. Das weitere Procedere ist im Kapitel Mikroskopie (3.8) beschrieben.

#### 3.7 Radixinplasmid

Das Plasmid RG207953 (**Abbildung 10**, OriGene® Technologies, Inc., Rockville, USA) enthält die kodierende Sequenz für die Isoform 3 (NM\_002906) des humanen Radixins. Die genomische Sequenzanalyse der Isoformen wurde mit Hilfe des *Ensembl Genome Server* (<http://www.ensembl.org/>) erstellt. Im Anhang finden sich die Sequenzanalysen der Isoform 3 sowie das Plasmid zur Visualisierung des Gens dargestellt im FASTA Format. Fluoreszenzmarkierte Plasmide werden genutzt um das erfolgreich klonierte Gen zu identifizieren und ein visuelles Readout für das Protein zu erhalten. Des weiteren enthält ein Plasmid eine Promoterregion, Schnittstellen für Restriktionsenzyme, sowie Sequenzen, die eine Antibiotikaresistenz vermitteln. Die Ampicillinresistenz führt zu einem Selektionsvorteil in den Bakterien oder Zellen, die erfolgreich mit dem Plasmid transfiziert wurden. Der Cytomegalivirus - Promoter (CMV-Promoter) führt zu einer Überexpression des kodierten Proteins in den transfizierten Zellen [81].



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des verwendeten Radixin Plasmids RG207953.**  
Sequenzen : RDX - Radixin, GFP - grün fluoreszierende Protein, Amp - Ampicillin Resistenz.

Das Plasmid hat insgesamt eine Sequenzlänge von 8309 Basenpaaren. Der verwendete Expressionsvektor pCMV6-AC-GFP ist ein Säugetier Vektor mit C-terminalem GFP-Tag. Vor dem Startcodon ATG findet sich die Kozak Sequenz ATCGCC [82]. Der offene Leserahmen (ORF) besitzt 1749 Basenpaare. Das Plasmid enthält kein Stopcodon. Die Sequenz ist damit 3 Basenpaare kürzer als die kodierende Sequenz in humanen Zellen. Anstelle dessen schließt sich C-terminal direkt die Kodierung für das GFP-Tag an.

Das humane Radixin Gen hat 6 Isoformen, die mittels *Multiple Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; siehe Anhang) untereinander und mit dem Plasmid verglichen wurden. **Tabelle 6** zeigt eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse des *Multiple Sequence Alignment* (siehe Anhang). In den untranslatierten Bereichen (UTR) liegen regulatorische Sequenzen, etwa Bindestellen für Proteine, welche die Stabilität der mRNA oder die Translation beeinflussen können [83, 84]. Der ORF im Plasmid kodiert nicht für das 5' / 3' UTR.

NCBI Reference Sequence	Isoform	Basenpaare	
		mit 5'/3' UTR	kodierende Sequenz
NM_001260492	1	2761	1815
NM_001260493	2	2511	1815
NM_002906	3	4491	1752
human_Radixin_Plasmid		-	1749
NM_001260494	4	4117	1344
NM_001260495	5	1814	774
NM_001260496	6	1549	603

**Tabelle 6:** Übersicht über die einzelnen Isoformen von Radixin und die Länge ihrer Sequenzen.

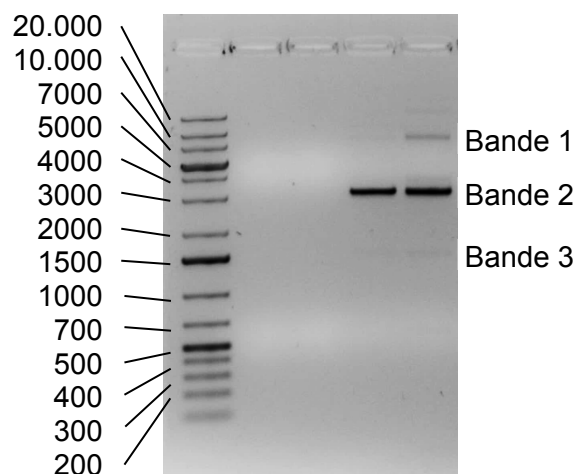
#### 3.7.1 Plasmidisolierung

Das Plasmid enthält die Sequenz Colicin E1 (Col E1), die als Replikationsursprung (ORI) dient. Die ORI ist kompatibel zu dem Bakterienstamm E. Coli stbl3 (#A10469 Thermo Scientific®, Massachusetts, USA), so dass das Plasmid unabhängig von der chromosomalen DNA in den Bakterien repliziert werden kann. Das Plasmid wurde in einem Glycerolstock bei -80°C geliefert. Mit einer Impföse wurden die Bakterien auf Agarplatten (25 g/l Lysogeny Broth (LB) Medium, 15 g/l Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Nach 24 Stunden (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) wurde eine vereinzelter Kultur erneut auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen. Wiederum nach 24 Stunden wurden nun 150 ml LB-Medium (25 g/l LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) in einem Erlenmeyerkolben mit einer singulären Bakterienkultur beimpft. Nach 12 Stunden (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) Wachstum auf einer Schüttelplatte (180 rpm) war die Flüssigkultur leicht trüb und es konnte mit der Plasmidisolierung fortgefahren werden. Die Plasmidisolierung aus 150 ml flüssiger Bakterienkultur erfolgte anhand des Protokolls mit dem ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit (#D4203 Zymo Research Corp.®, Irvine, USA).



#### 3.7.2 Konzentrationsbestimmung und Gelelektrophorese

Aus Bakterien präparierte Plasmide können in unterschiedlichen Konformationen vorliegen: linear, offenkettig-zirkulär und superspiralisiert (*supercoiled*). Diese Strukturen sind als Banden in einer Gelelektrophorese darstellbar. Für die denaturierende Gelelektrophorese wurde 1% (v/v) Agarose in 60 ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) in einem Becherglas gelöst und für 20 Sekunden auf 100°C erhitzt. In das auf 60°C abgekühlte Gemisch wurden 6 µl Ethidiumbromid pipettiert. Nun wurde das noch flüssige Gel in die vorbereitete Gelkammer gegossen und lichtgeschützt ausgehärtet. Anschließend wurde die Kammer mit kaltem TAE-Puffer geflutet und der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. 100 ng pDNA (1 Teil) wurden mit 6x Loading Dye (5 Teile) gemischt. In Lasche 1 wurde 1 µl kB DNA Leiter (#SM133 Thermo Scientific®, Massachusetts, USA) pipettiert. In die restlichen Taschen wurde 6 µl Probengemisch eingefüllt und bei geschlossenem Deckel der Gelkammer für 1 bis 1,5 Stunden eine Spannung von 120 Volt angelegt (PowerPac1000 Bio-Rad®, München, Deutschland), um die Proben aufzutrennen. Die Ablichtung und Auswertung der Gele fand an der G:BOX (Syngene®, Cambridge, Großbritannien) statt.



**Abbildung 11: Gelelektrophorese des isolierten Radixin Plasmids.** Links ist der Längenmarker mit der Anzahl der Basenpaare zu sehen. Die aufgetrennte pDNA zeigt mehrere Banden auf. Bande 1 bei ~ 9000 Basenpaaren (zirkuläre DNA), Bande 2 bei ~ 4500 Basenpaare (lineare DNA), Bande 3 (schwer zu erkennen) bei ~ 1700 Basenpaaren (*supercoiled* DNA).

Die Konzentration und Reinheit der Plasmid DNA (pDNA) wurde durch spektrophotometrische Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm mittels NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®, Massachusetts, USA) in 1 µl Probe bestimmt.

Die gemessene Konzentration betrug 3676,67 ng/ml. Das Messprinzip des Extinktionskoeffizienten ist in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Gelelektrophorese des aufgereinigten Plasmids (**Abbildung 11**) ergab 3 Banden. Bande 1 liegt etwa auf Höhe von ~ 9000 Basenpaaren und entspricht damit der entspannt zirkulären Form des Plasmids (nicked circled DNA). Bande 2 hat eine Laufweite von ~ 4500 Basenpaaren und kongruiert mit der linearen Form des Plasmids. Bande 3 ist bei ~ 1700 Basenpaaren zu sehen. Sie entspricht der superspiralisierten (*supercoiled*) Form des Plasmids. Kompakte, superhelikale DNA wandert im elektrischen Feld schneller als gleich große lineare oder entspannt zirkuläre DNA.

#### 3.7.3 Transfektion

Die isolierte pDNA des Radixin Plasmids wurde in HepG2-Zellen transfiziert. Die Transfektion der pDNA erfolgte mittels der Multikompartment Mizelle: Polybutadiene-block-poly(methacrylicacid)-block-poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylate (BMAAD) [85]. Vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit 1 ml HBSS gewaschen. Sodann wurde 400 µl Opti-MEM pro Well (reduziertes Serum Medium #31985070 gibco®, Massachusetts, USA) auf die Zellen gegeben und 30 min inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die vorbereitete Mizellen - pDNA Komplexe (**Tabelle 7**) wurden nun hinzugegeben und für 6 Stunden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch frisches HepG2 Medium mit Zusätzen (500 µl) ersetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte dann für 24 Stunden im Brutschrank.

Transfektion
BMAAD (Konzentration 0,4 mg/ml) 1 Stunde bei RT equilibrieren
1 µg pDNA mit HBG auf 30 µl auffüllen
15 µg BMAAD hinzugeben
10 Sekunden vortexen
20 Minuten bei RT inkubieren
32,5 µl HBG hinzugeben
100 µl Mizellen-Lösung in 400 µl Opti-MEM auf die Zellen geben

**Tabelle 7: Workflow - Vorbereitung der Mizellen - pDNA - Komplexe.** Volumen angegeben pro Well. HBG - Hepes-buffered-glucose (20 mmol/l Hepes, 1 g/l Glukose).

### 3.8 Mikroskopie

#### 3.8.1 Lichtmikroskopie

Zur Kontrolle und Darstellung von Zellen, Zellkulturen und Sphäroiden wurde das Lichtmikroskop Primo-Vert (Carl Zeiss® GmbH, Jena, Deutschland) mit einem 20x Objektiv verwendet.

#### 3.8.2 *Laser Scanning* Mikroskopie

Die Proben wurden an einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (LSM-780, Carl Zeiss® GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Dafür wurde ein Plan-Apochromat 20x Objektiv mit einer Numerischen Apertur von 0,8 und ein LD C-Apochromat 63x Objektiv mit einer Numerischen Apertur von 1,15 und Wasser-Öl-Emulsion verwendet. Der Scanbereich von 424,7  $\mu\text{m}^2$  wurde durch 1024x1024 Pixel aufgelöst. Um das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu verbessern, wurde eine Pixel-Dwell Zeit von 1,58  $\mu\text{s}$  verwendet und ein Mittelwert von vier Aufnahmen pro Pixel generiert. Das AF 488 wurde mittels Argon2-Laser bei 488 nm angeregt. Das AF 568 wurde mittels Helium/Neon-Laser bei 561 nm angeregt. Das AF 647 wurde mittels Helium/Neon-Laser bei 633 nm angeregt. Das C-terminale TurboGFP des markierten Radixins wurde mit 488 nm angeregt. Die Emission wurde mittels *Photomultiplier Tube* (PMT) detektiert. DAPI wurde durch eine Laser-Diode (405-475 nm) angeregt und emittiertes Licht zwischen 410-480 nm an einem PMT detektiert. Fotografien wurden mit der ZEN Imaging Software SP1® (Carl Zeiss® GmbH, Jena, Deutschland) angefertigt. Die Auswertung der mit dem konfokalen LSM 780 aufgenommenen Bilder erfolgte mit der FIJI Software ImageJ® 1.49b. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ. Dazu wurde die jeweilige Bildreihe in FIJI importiert und in verschiedene Kanäle aufgetrennt.

### 3.9 Auswertung mit FIJI Software ImageJ®

#### 3.9.1 Auswertung der Immunfluoreszenz

Das Fluoreszenzsignal in einem Bild stellt die Rezeptor-Antikörper-Komplexe in den gefärbten HepaRG-Zellen dar. Um Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können wurden drei unabhängige Versuchsansätze zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit je 5 biologischen Replikaten geplant. Von jedem biologischen Replikat wurden 5 Bilder angefertigt. Ausgewertet wurde die *Integrated Density* (IntDen) eines jeden Replikats, gemittelt über 5 Bilder. Die integrierte Dichte (IntDen) ist ein kalkulierter Wert, der das Verhältnis von Fläche und Fluoreszenzintensität verdeutlicht (Area x Mean Gray Value).

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte jeweils innerhalb eines Versuchs relativ zur Kontrolle. Es wurden keine nicht-linearen Dekompensationsmethoden angewandt.

#### 3.9.2 Auswertung Lebendzellmikroskopie

In den angefertigten Bildern des Lebendzellmikroskopie entsprechen die fluoreszierenden Bereiche dem funktionellen Exkretionsvermögen der gallengangsähnlichen Struktur. Es wurden vier biologische Replikate angefertigt, von jedem Replikat wurden vier Bilder erstellt und der Mittelwert berechnet. Ausgewertet wurde in diesem Versuchsansatz der mittlere Intensitätsanstieg über 20 Minuten. Dafür wurde das Produkt aus fluoreszierender Gesamtfläche (*Total Area*) und durchschnittlicher Intensität (*Mean*) durch 20 dividiert.

$$CMFDA \text{ (mittlerer Intensitätsanstieg)} = \frac{(Total\ Area \times Mean)}{20}$$

#### 3.9.3 Auswertung GFP-tagged Radixin

Analysiert wurde die Lokalisationsänderung und die Änderungen in der Fluoreszenzintensität nach Stimulation der Zellen mit 1 µmol/l PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat). Über die fluoreszierenden Membranabschnitte wurden *Region of Interest* gelegt (ROI) und Intensitätsprofile erstellt. In diesen stellt X-Achse den Abstand in µm dar, während auf der Y-Achse die Intensitäten aufgetragen werden. 0, 1, 5, 10 und 15 Minuten nach Stimulation der Zellen wurde ein Intensitätsprofil erstellt und die Halbwertsbreite verglichen.

### 3.10 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

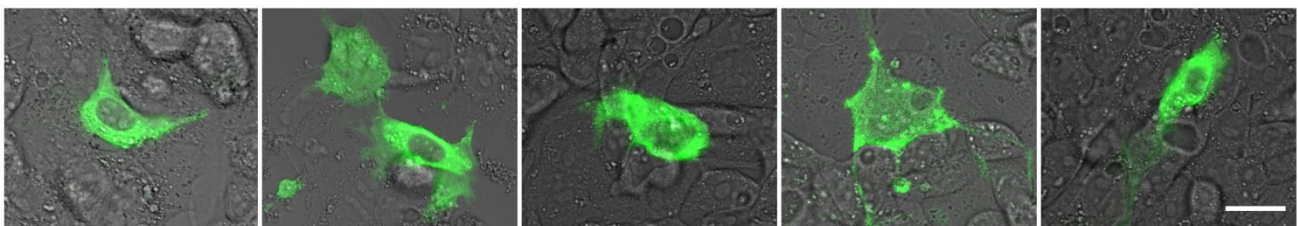
Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit GraphPad Prism<sup>®</sup> Software 6 (San Diego, USA). Für die weitere Datenverwaltung und Berechnungen wurde Microsoft Office Excel 2010<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, USA) verwendet. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk Test überprüft. Normalverteilte Daten wurden mit dem t-Test auf Signifikanz getestet. Nichtparametrische Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Alle signifikanten Unterschiede sind in den Abbildungen mit \* gekennzeichnet. ( \* : p-Werte ≤ 0,05; \*\* : p-Werte ≤ 0,01; \*\*\* : p-Werte ≤ 0,001)

## 4 Ergebnisse

Bei der folgenden Darstellung der Resultate sind funktionelle von molekularen Untersuchungsergebnissen zu unterscheiden. Erstere sollen eine physiologische oder eingeschränkte Exkretionsleistung in der verwendeten Zelllinie charakterisieren, molekulare Untersuchungen die zu Grunde liegende Signaltransduktion erfassen. Die Ergebnisse aus der Transfektion von Hepatozyten mit GFP-Radixin können als Verbindung dieser beiden Ebenen verstanden werden.

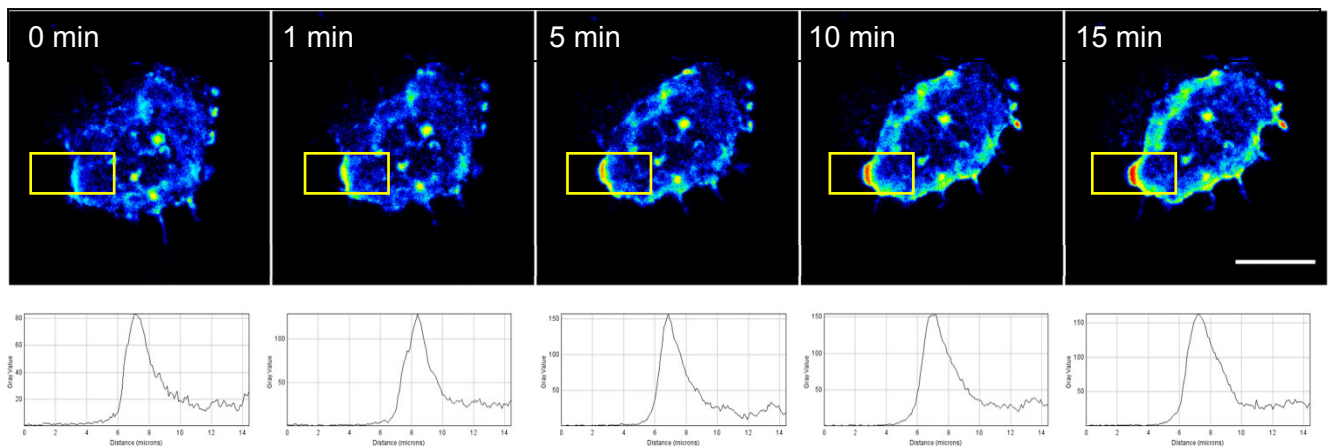
### 4.1 Effekte von PMA auf das Strukturprotein Radixin in HepG2-Zellen

Die Transfektion von grün fluoreszierendem Radixin in HepG2-Zellen zeigt eine cytosolische Verteilung von Radixin mit einer deutlichen Akkumulation an der Zellmembran. Die Zellkerne blieben stets fluoreszenzfrei (siehe **Abbildung 12**). Auf eine Stimulation mit 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) zeigen sich moderate Änderungen der Fluoreszenzintensität (gesamt sowie membranär betrachtet).



**Abbildung 12: GFP-Radixin transfizierte HepG2-Zellen.** Maßstabsbalken= 20  $\mu\text{m}$ . Vergrößerung 40x Objektiv LSM780

**Abbildung 13** zeigt repräsentativ eine erfolgreich transfizierte HepG2-Zelle mit ausgeprägter GFP-Radixin Fluoreszenz (dargestellt ist der zur Auswertung verwendete *LUT 16 colors* - Modus). Die Stimulation mit 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz an der Membran der Zelle. Um die Zunahme dieser Fluoreszenz quantitativ auswerten zu können, wurden Intensitätsprofile eines Membranabschnitts (gelb markierter Ausschnitt) angefertigt. Die gemessene Fluoreszenz in diesem Abschnitt nimmt von maximal 82,1 (0 Minuten) auf über 182,2 nach 15 Minuten zu (siehe **Tabelle 8**).

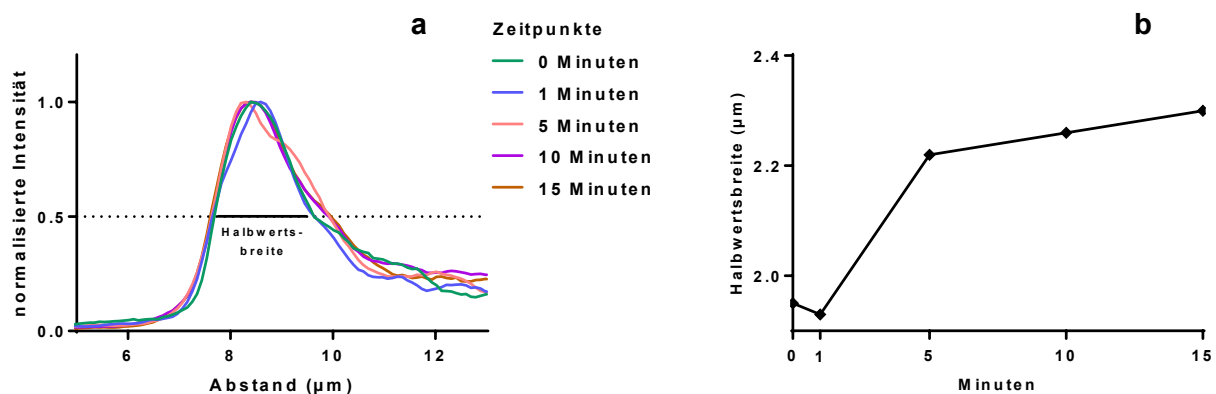


**Abbildung 13: Lebendzellmikroskopie. Stimulation einer GFP-Radixin transfizierten HepG2-Zelle mit 1 µmol/l PMA.** gelbes Rechteck=gemessener Membranabschnitt. Die Graphen stellen das jeweilige Intensitätsprofil des Membranabschnitts dar (x-Achse=Abstand in µm, y-Achse=Fluoreszenzintensität). Maßstabsbalken=15 µm. Vergrößerung 63x Objektiv LSM780

	0 min	1 min	5 min	10 min	15 min
maximale Intensität	82,12	126,60	134,49	163,31	182,23
halb maximale Intensität	41,06	63,30	67,24	81,66	91,11
y-Wert links (µm)	7,79	7,77	7,76	7,74	7,72
y-Wert rechts (µm)	9,74	9,71	9,97	10,00	10,01
Halbwertsbreite Abstand (µm)	1,95	1,93	2,22	2,26	2,30

**Tabelle 8: Werte aus den erstellten Intensitätsprofilen einer fluoreszierenden, hepatozytären Membran.** Die Auswertung ergibt eine Intensitätszunahme und eine Zunahme der Membrandicke. Einzelheiten sind im Fließtext beschrieben.

Diese Veränderungen an der Membran wurden genauer charakterisiert. **Abbildung 14 a** erlaubt die Darstellung und Berechnung der Halbwertsbreiten. So kann eine Aussage über die Membrandicke getroffen werden. Die Halbwertsbreite einer repräsentativen, unstimulierten HepG2-Zelle beträgt 1,95 µm. **Abbildung 14 b** zeigt eine Zunahme der Halbwertsbreite um 0,35 µm über einen Zeitraum von 15 Minuten nach Stimulation mit 1 µmol/l PMA.



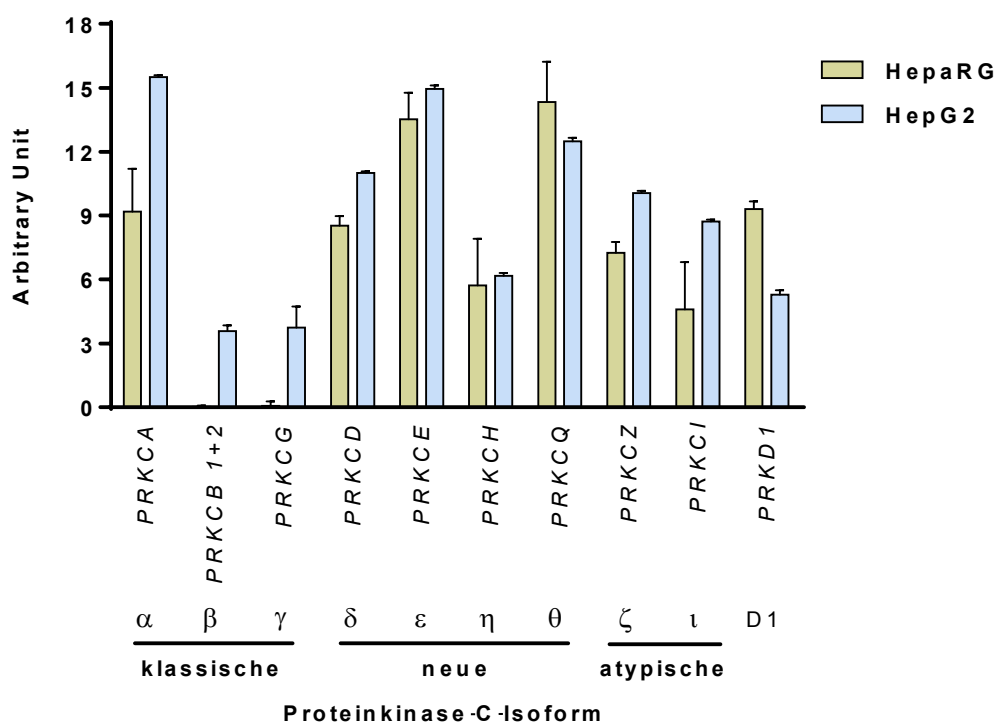
**Abbildung 14: Auswertung der Intensitätsprofile nach Stimulation einer GFP-Radixin transfizierten HepG2-Zelle.** a) Überlagerung der normalisierten Intensitätsprofile b) ermittelte Halbwertsbreite zu verschiedenen Zeitpunkten.

## 4.2 Genexpression

Für die Genexpressionsanalyse wurde das etablierte Modell der HepaRG-Monolayer Zellkultur verwendet. Die Lysate der unstimulierten und stimulierten HepaRG-Zellen wurden auf eine veränderte Expression der PKC-Isoformen sowie dem kanalikulären Transportprotein MRP2 untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse als Balkendiagramme und Boxplots dargestellt.

### 4.2.1 Genexpressionsprofil der PKC-Isoformen in HepaRG- und HepG2-Zellen

**Abbildung 15** beschreibt die quantitativen Verhältnisse der Expression der einzelnen PKC-Isoformen in den beiden verwendeten Zellkulturlinien in Form eines Genexpressionsprofil. Das Balkendiagramm zeigt vergleichbare Muster in den Expressionsprofilen der beiden Leberzelllinien.



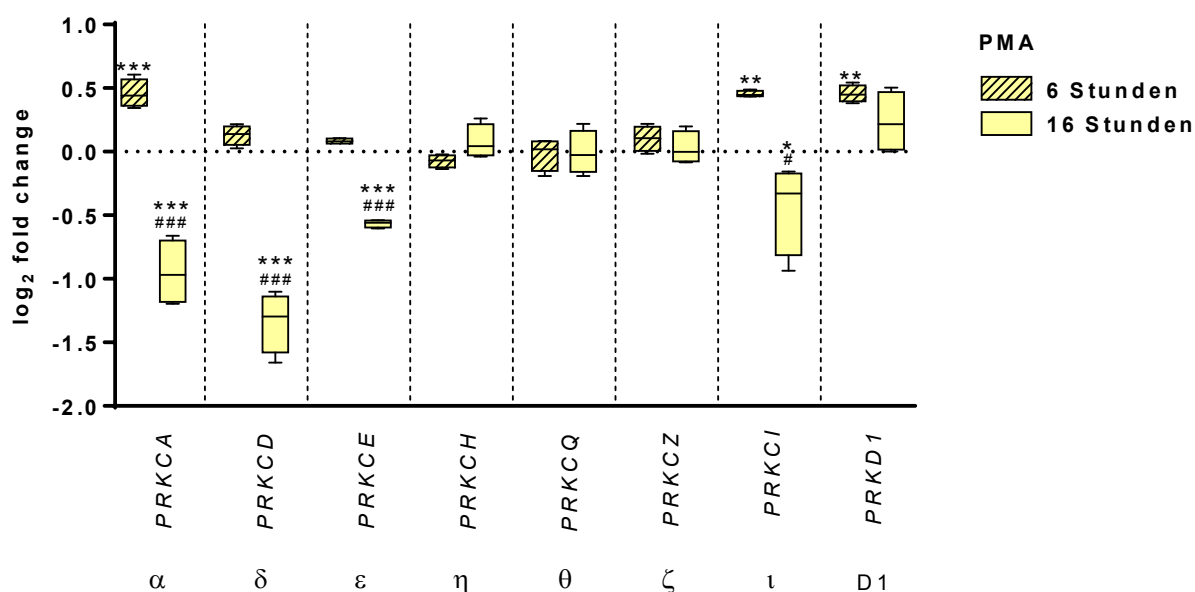
**Abbildung 15: Genexpressionsprofil der PKC-Isoformen in den verwendeten Zelllinien.** Arbitrary Unit (AU)=normalisierte  $C_t$  - Werte (siehe Kapitel 3.2.12). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; n=16

In HepaRG-Zellen dominieren PKC  $\theta > \varepsilon$ , neue PKC-Isoformen. Am zweithäufigsten werden PKC  $\alpha > D1 > \delta$  exprimiert. Die klassischen PKC  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma$  werden in HepaRG-Zellen nicht exprimiert. In HepG2-Zellen dominieren  $\alpha > \varepsilon > \theta$ , am zweithäufigsten werden  $\delta > \zeta > \iota$  exprimiert. Die PKC  $\alpha$  tritt in HepG2-Zellen stärker in Erscheinung als in HepaRG-Zellen.

In HepG2-Zellen scheinen neben der klassischen PKC  $\alpha$  auch Transkripte der PKC  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma$  vorhanden zu sein. Zur Kontrolle der Primer im Hinblick auf Funktionalität und Spezifität wurden dieselben in Proben von humanem Gehirn zur Expressionsanalyse eingesetzt. Dort konnte eine deutliche Expression von PKC  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma$  nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

#### 4.2.2 Genexpressionsanalyse nach Stimulation

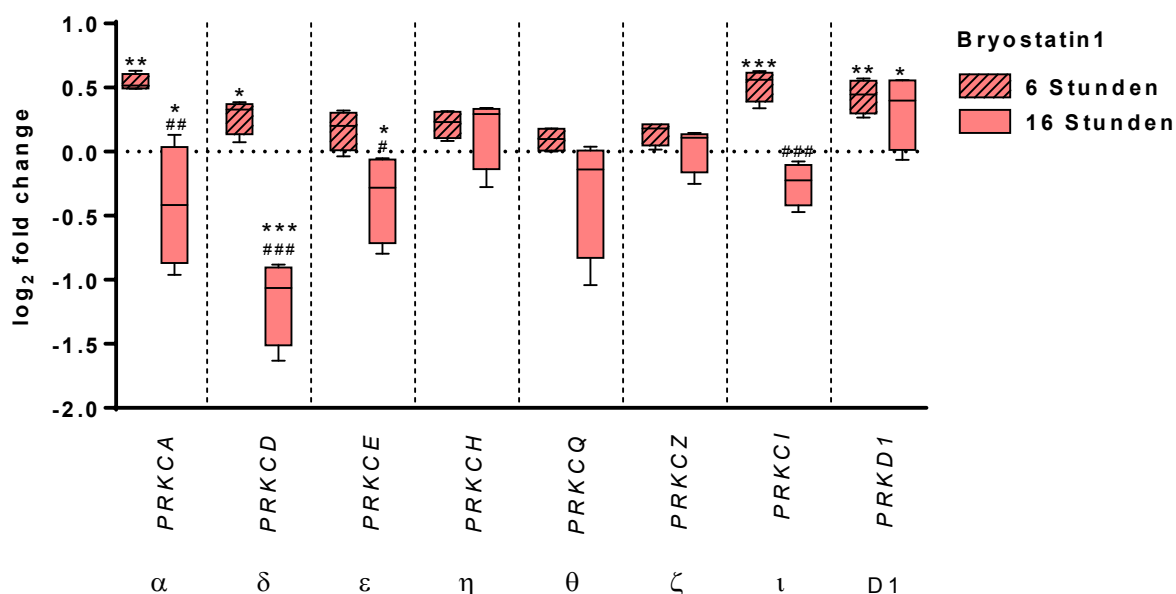
Die folgenden Darstellungen geben eine Übersicht über die Effekte der PKC-Aktivatoren PMA und Bryostatin 1 sowie des PI3K $\gamma$  Aktivators *N*-Formylmethionin-leucyl-phenylalanin (NfMLP) und des Cytokinmixes auf die Expression der PKC-Isoformen in HepaRG-Zellen. Nachdem das Expressionsprofil gezeigt hatte, dass die klassischen PKC  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma$  nicht detektierbar waren, wurden sie in die weiteren Genexpressionsexperimente nicht miteinbezogen. Im Anhang findet sich eine Tabelle mit Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen sowie den p-Werten.



**Abbildung 16: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit 100 nmol/l PMA.** Änderung der Transkriptionsraten ( $\log_2$  fold change) von PKC-Isoformen in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden und 16 Stunden Stimulation; relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur 6 Stunden Gruppe. \*, # : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*, ## : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\*, ### : p-Wert  $\leq 0,001$ )



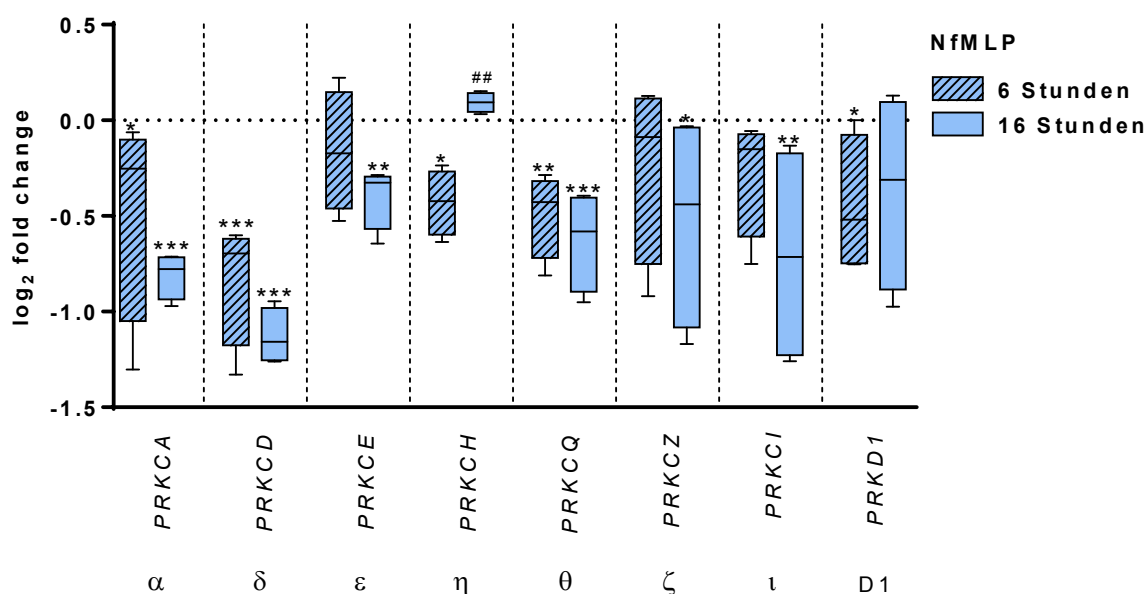
**Abbildung 16** zeigt, dass die PKC  $\alpha$ ,  $\iota$  und D1 nach 6 Stunden Stimulation mit PMA signifikant hochreguliert ist. PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ , und  $\iota$  zeigen nach 16 Stunden eine signifikant verminderte Expression. Die Expressionsänderung zwischen den beiden Zeitpunkten ist bei PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\iota$  signifikant. Die Proteinkinase D1 ist auch nach 16 Stunden PMA-Stimulation stärker exprimiert als in der Kontrolle, jedoch nicht signifikant. PKC  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$  zeigen keine signifikanten Expressionsänderungen. **Abbildung 17** zeigt die Genexpressionsänderung der PKC-Isoformen nach Bryostatin 1-Stimulation.



**Abbildung 17: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit 100 nmol/l Bryostatin 1.** Änderung der Transkriptionsraten ( $\log_2$  fold change) von PKC-Isoformen in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden und 16 Stunden Stimulation; relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur 6 Stunden Gruppe. \*, # : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*, ## : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\*, ### : p-Wert  $\leq 0,001$ )

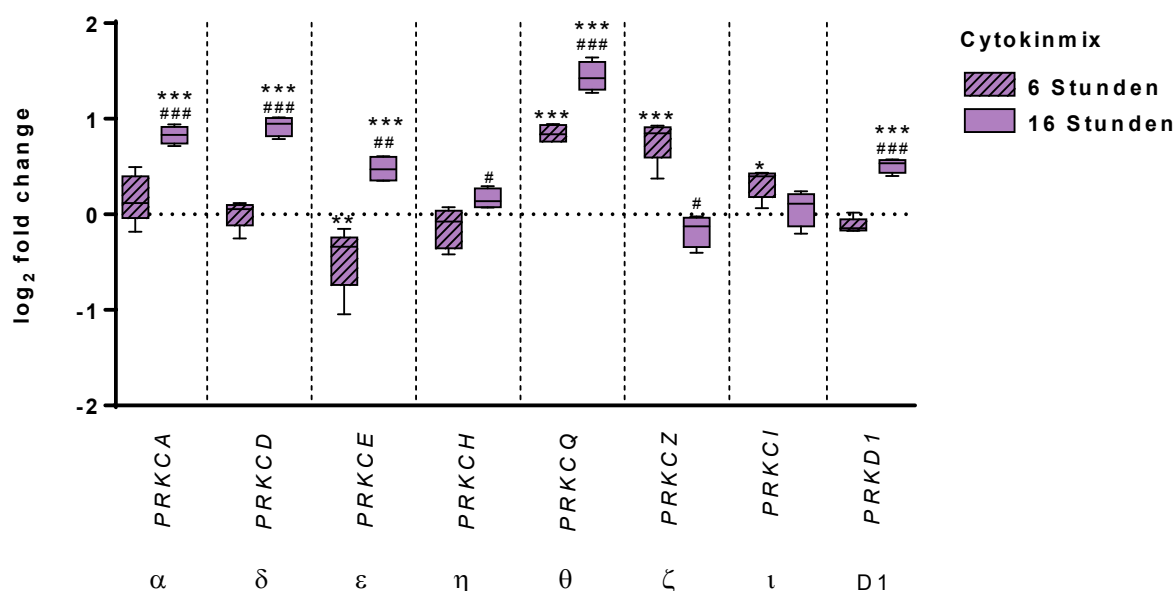
Nach 6 stündiger Stimulation mit Bryostatin 1 sind PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\iota$  und D1 signifikant, PKC  $\varepsilon$  nicht signifikant, hochreguliert. Nach 16 Stunden sind diese Proteinkinasen, bis auf PKD1 signifikant herunterreguliert. Der Unterschied zwischen den Zeitpunkten ist bei PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\iota$  signifikant. PKD1 bleibt über 16 Stunden Bryostatin 1-Stimulation höher exprimiert. Die PKC  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$  zeigen kaum Expressionsveränderungen (leichter, nicht signifikanter Abfall nach 16 Stunden). **Abbildung 16** und **Abbildung 17** zeigen, dass sowohl PMA als auch Bryostatin 1 nach 6 Stunden bei PKC-Isoformen zu signifikanten Heraufregulierungen auf Genexpressionsebene führen. Nach 16 Stunden sinkt die Expressionsrate jedoch tendenziell ab.

**Abbildung 18** stellt die Auswirkungen der Stimulation mit NfMLP auf die Expression der PKC-Isoformen dar. NfMLP führt bei den PKC-Isoformen zu signifikanten Herabregulierungen. Nur die PKC  $\eta$  erreicht nach 16 Stunden Stimulation mit NfMLP wieder das Normalniveau.



**Abbildung 18: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit 100 nmol/l NfMLP.** Änderung der Transkriptionsraten ( $\log_2$  fold change) von PKC-Isoformen in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden und 16 Stunden Stimulation; relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur 6 Stunden Gruppe. \*, # : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*, ## : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\*, ### : p-Wert  $\leq 0,001$ )

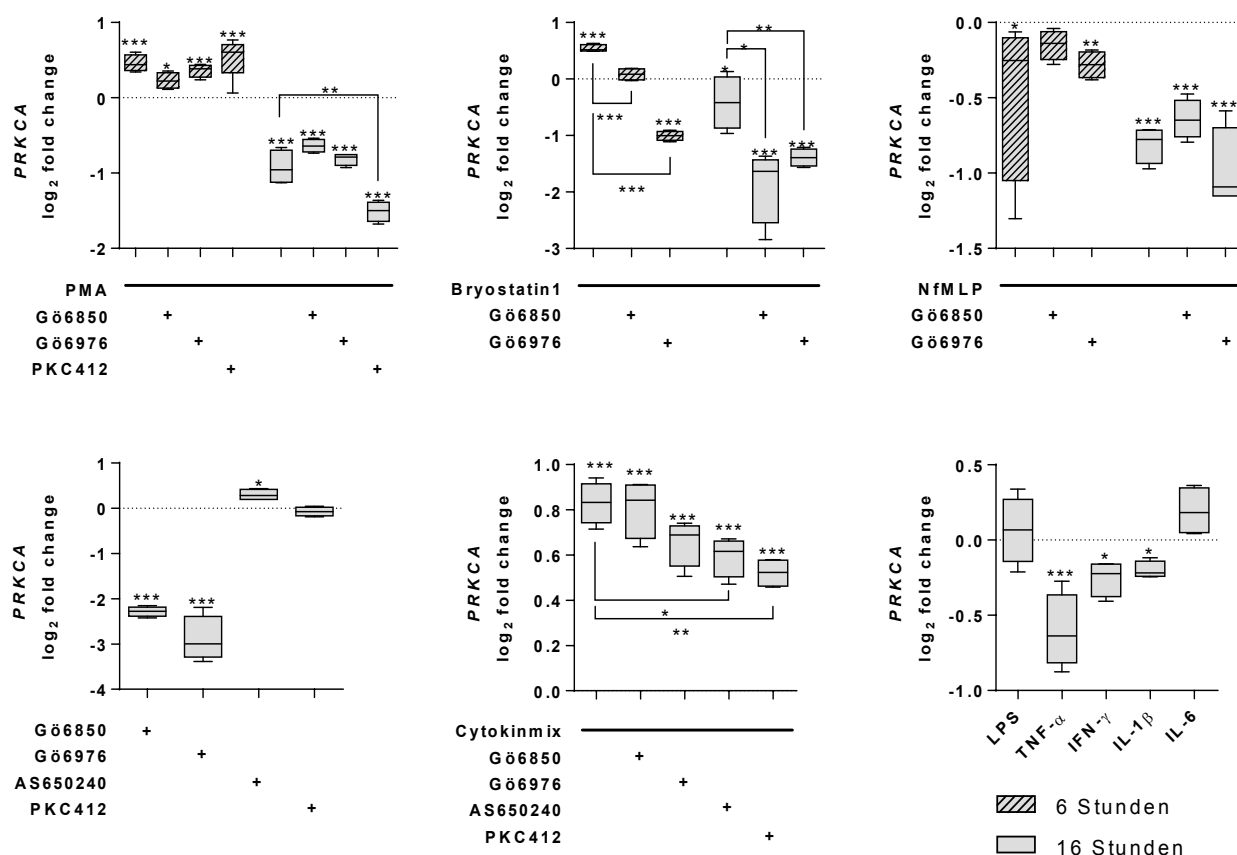
**Abbildung 19** zeigt die Genexpressionsänderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit Cytokinmix.



**Abbildung 19: Übersicht über die Expressionsveränderung der PKC-Isoformen nach Stimulation mit Cytokinmix.** Änderung der Transkriptionsraten ( $\log_2$  fold change) von PKC-Isoformen in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden und 16 Stunden Stimulation; relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS.  $n=5$ . Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur 6 Stunden Gruppe. \*, # :  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*, ## :  $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\*, ### :  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ )

Die Stimulation über 6 und 16 Stunden mit Cytokinmix führt zu einer Erhöhung der Genexpression von Proteinkinase-C-Isoformen. Alleine die PKC  $\epsilon$  wird nach 6 Stunden signifikant geringer exprimiert. Die PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und D1 erfahren durch die Stimulation mit dem Cytokinmix eine hochsignifikante Heraufregulierung, die PKC  $\theta$  bereits nach 6 Stunden. Die atypischen Isoformen  $\zeta$  und  $\iota$  zeigen signifikante Expressionssteigerungen nach 6 Stunden, sind aber nach 16 Stunden wieder auf Normalniveau exprimiert. Die Isoform  $\eta$  zeigt nach Cytokinmix-Stimulation keine signifikanten Änderungen auf Genexpressionsebene

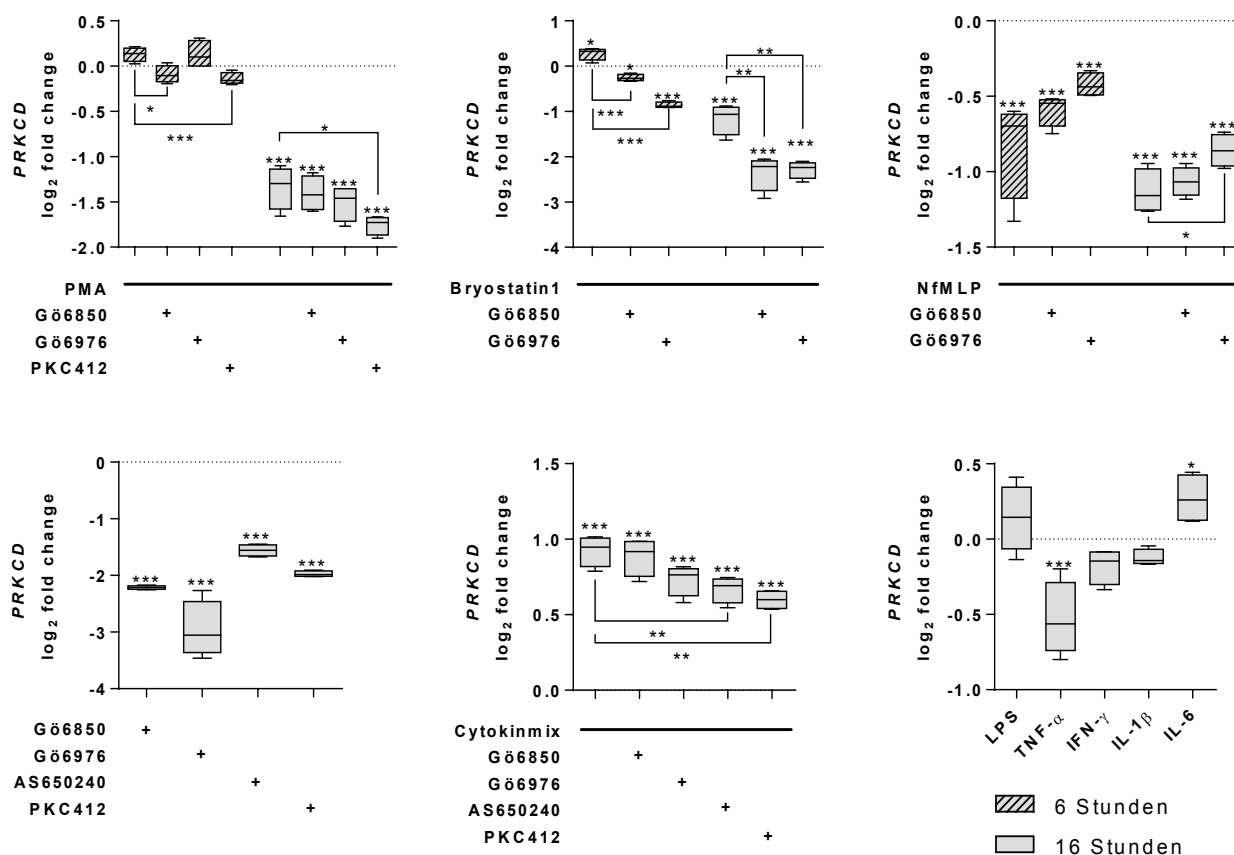
Im Folgenden sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für jede PKC-Isoform sowie MRP2 dargestellt. **Abbildung 20** stellt die Expressionsänderungen der PKC  $\alpha$  dar.



**Abbildung 20: Genexpressionsanalyse der klassischen PRKCA nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von PRKCA in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, G6850 200 nmol/l, G6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

PMA führt nach 6 Stunden zu einer Hochregulierung, nach 16 Stunden zu einer Herabregulierung der PKC  $\alpha$ . PKC412 senkt diese nach 16 Stunden nochmals signifikant. Die Regulierung durch Bryostatin 1 wird durch die Inhibitoren G6850 (Bisindolylmalimid 1) und G6976 zu beiden Zeitpunkten signifikant reduziert. Die Kostimulationen mit NfMLP führen zu einer signifikanten Expressionsreduktion. G6850 und G6976 sowie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  führen nach 16 Stunden zu einer signifikanten Herunterregulierung der PKC  $\alpha$ . Der Cytokinmix hat einen signifikant steigernden Einfluss auf die Genexpression der Kinase, der von der Wirkung des Inhibitors G6850 und G6976 gar nicht und von AS605240 und PKC412 nur wenig gemindert wird.

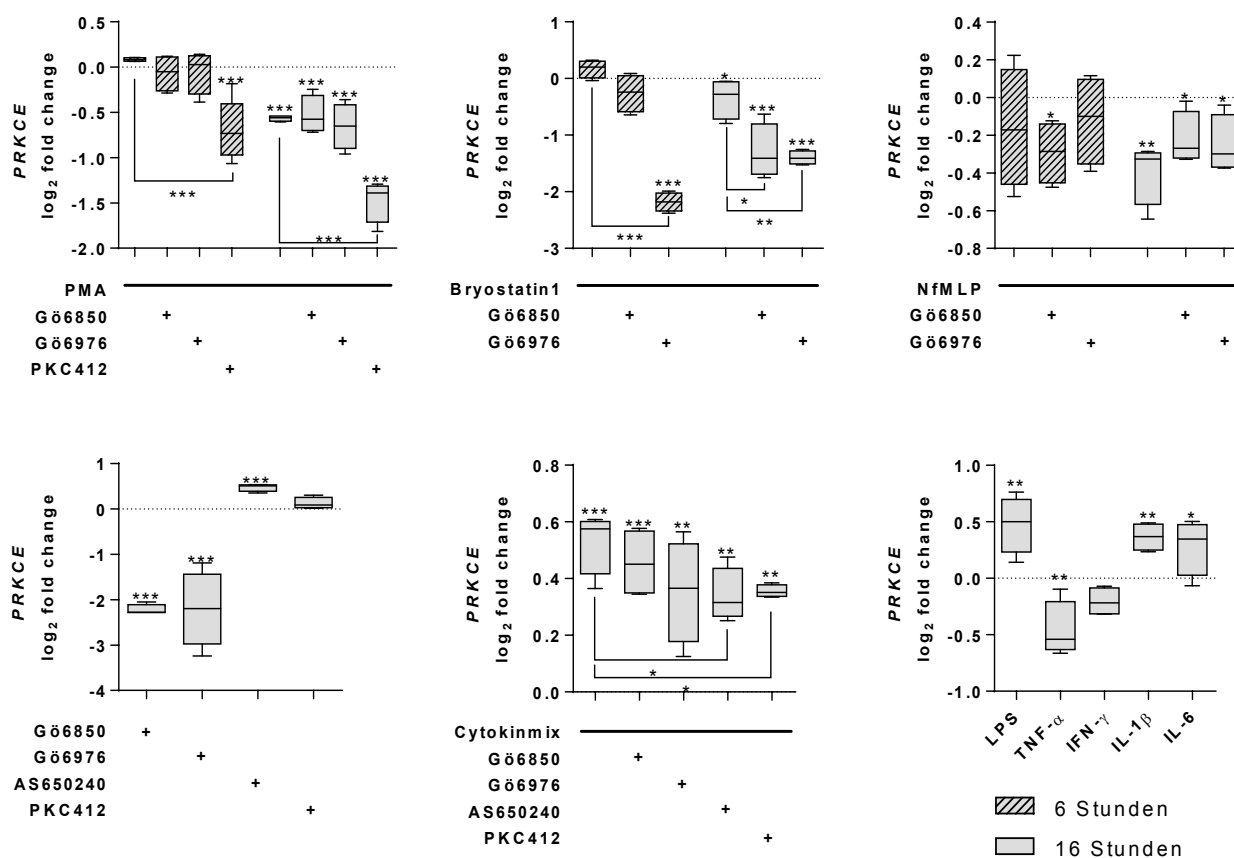
**Abbildung 21** stellt die Expressionsänderungen der PKC  $\delta$  nach Stimulation dar.



**Abbildung 21: Genexpressionsanalyse der neuen *PRKCD* nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von *PRKCD* in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

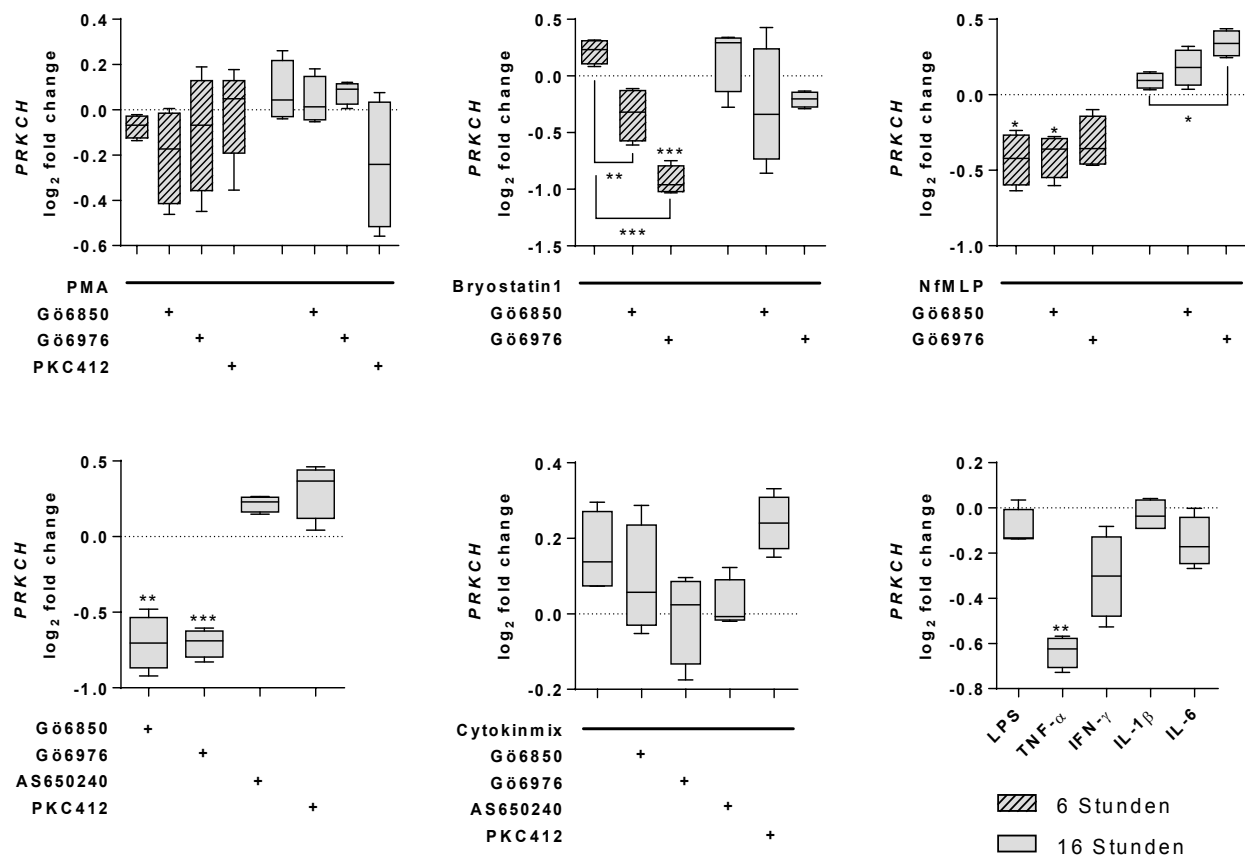
Die PKC  $\delta$  wird durch 6 stündige PMA-Stimulation in ihrer Expressionsrate nicht beeinflusst. Die Kostimulation mit Gö6850 und PKC412 führt nach 6 Stunden zu einer signifikanten Verringerung der Genexpression. Nach 16 Stunden führt die PMA-Stimulation in allen Gruppen zu einer signifikanten Herunterregulierung. Die Kostimulation mit PKC412 senkt die Expression am stärksten. Die zu beiden Zeitpunkten signifikante Regulierung durch Bryostatin 1 wird durch die Inhibitoren Gö6850 und Gö6976 signifikant reduziert. NfMLP führt zu einer Verringerung der Expressionsrate. Die Stimulationen mit Gö6850, Gö6976, AS650240 und PKC412, sowie TNF- $\alpha$  führen alle zu einer hochsignifikanten Absenkung der Genexpression. Der Cytokinmix hat einen signifikant steigernden Einfluss auf die Genexpression, AS650240 und PKC mildern diese Zunahme der Expression.

**Abbildung 22** stellt die Expressionsänderungen der PKC  $\epsilon$  nach Stimulation dar.



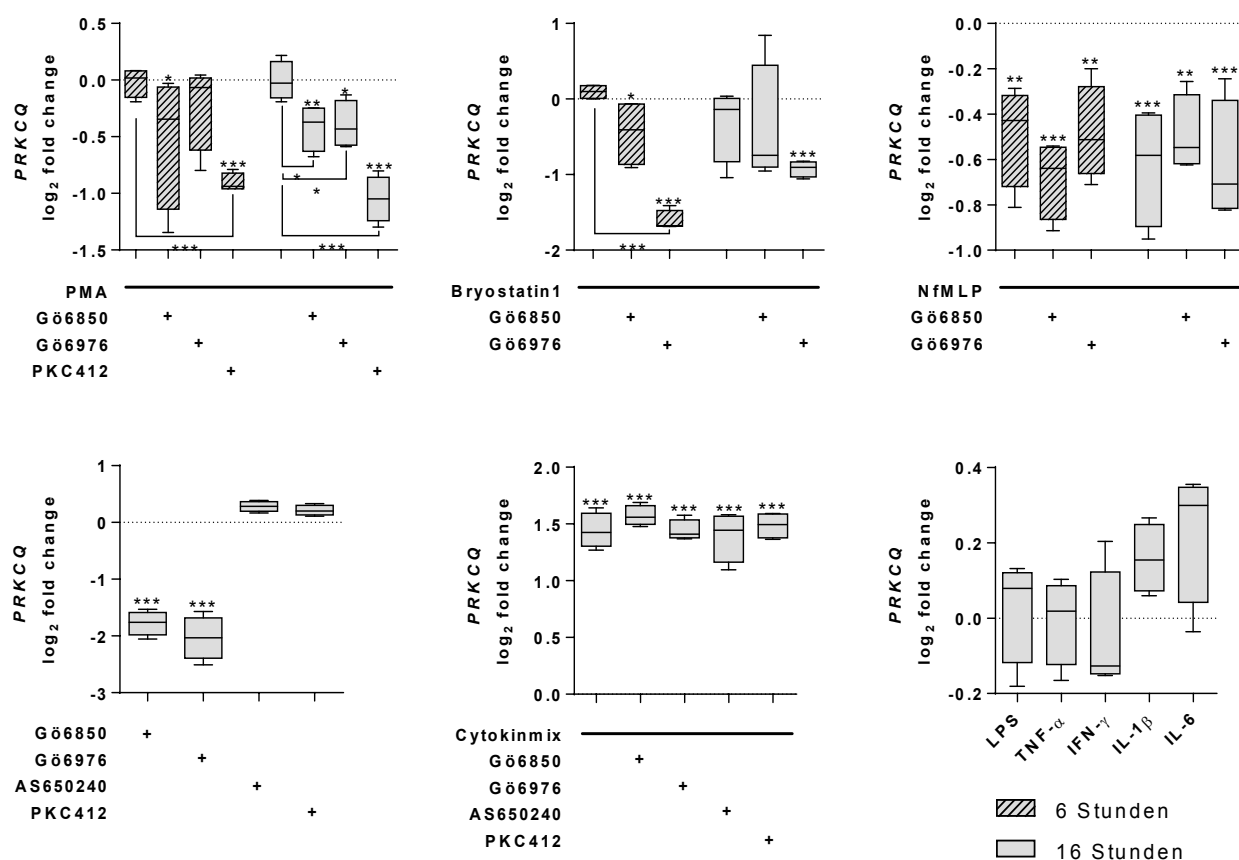
**Abbildung 22: Genexpressionsanalyse der neuen *PRKCE* nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von *PRKCE* in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

PMA führt nach 16 Stunden zu einer Herunterregulierung der PKC  $\epsilon$ . PKC412 senkt diese nochmals hochsignifikant. Die Genexpression der PKC  $\epsilon$  wird durch die Stimulation mit Bryostatin 1 und dem Inhibitor Gö6976 zu beiden Zeitpunkten, durch Gö6850 nach 16 Stunden signifikant reduziert. Die Kostimulationen mit NfMLP führen zu schwächeren Expressionsraten. Der Cytokinmix hat einen hochsignifikant steigernden Einfluss auf die Genexpression von PKC  $\epsilon$ . PKC412 schwächt diese Steigerung signifikant ab. Die PKC-Inhibitoren und TNF- $\alpha$  reduzieren, AS650240, LPS, IL-1 $\beta$  und IL-6 steigern die Transkriptionsrate signifikant.

**Abbildung 23** stellt die Expressionsänderungen der PKC  $\eta$  nach Stimulation dar.

**Abbildung 23: Genexpressionsanalyse der neuen *PRKCH* nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von *PRKCH* in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

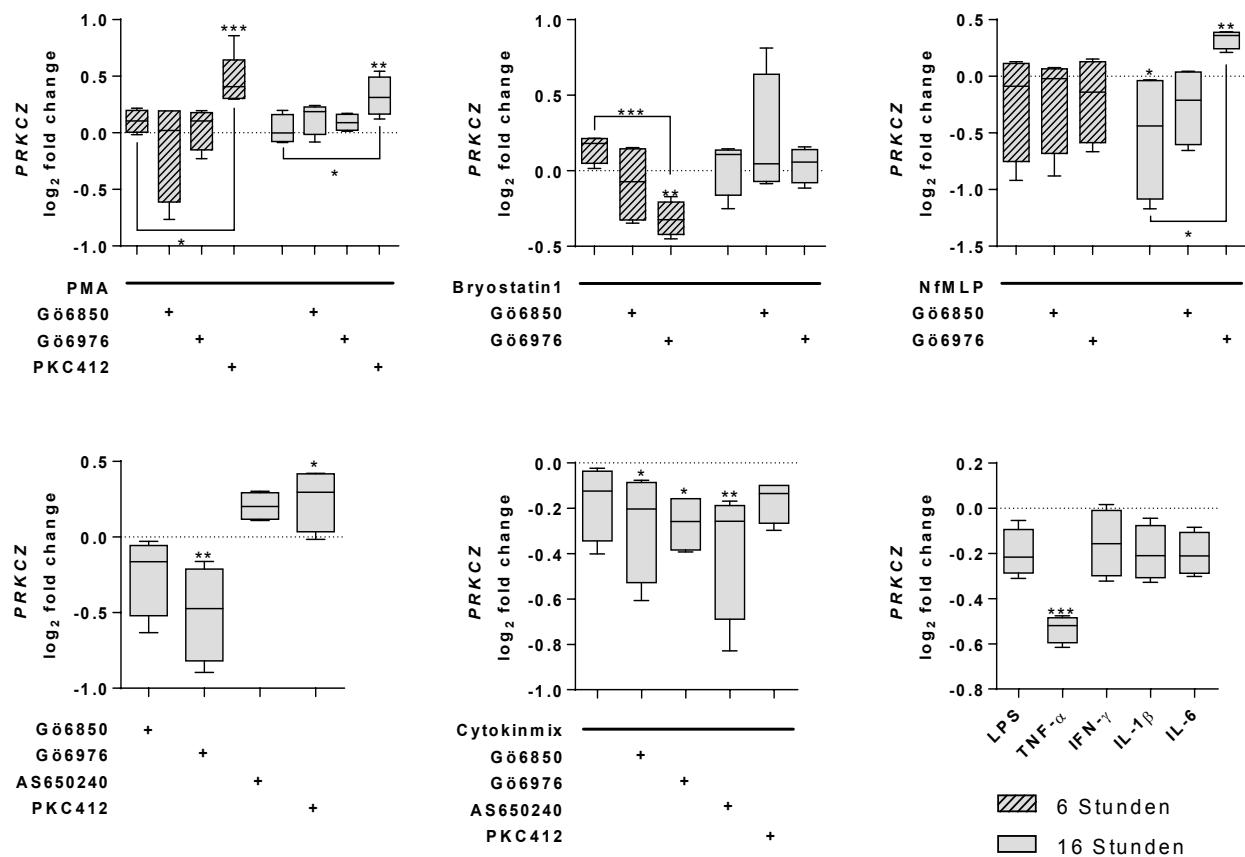
Die PKC  $\eta$  reagiert insgesamt mit sehr minimaler Änderung der Genexpression auf die Stimulation. Nach 6 stündiger Kostimulation mit Bryostatin 1 und Gö6976 nimmt die Expression im Vergleich zur Kontrolle und im Verhältnis zur alleinigen Bryostatin 1 Behandlung signifikant ab. 16 stündige Stimulation mit humanem TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  resultieren in einem Rückgang der Expression von PKC  $\eta$ . Die Stimulation mit den PKC-Inhibitoren Gö6850 und Gö6976 resultiert in einem signifikanten Abfall der Transkriptionsrate.

**Abbildung 24** stellt die Expressionsänderungen der PKC  $\theta$  nach Stimulation dar.

**Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der neuen *PRKCQ* nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von *PRKCQ* in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, G66850 200 nmol/l, G66976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert ≤ 0,05; \*\* : p-Wert ≤ 0,01; \*\*\* : p-Wert ≤ 0,001)

Die Genexpression der PKC  $\theta$  wird nach 6 und 16 Stunden durch PMA und Bryostatin 1 nicht reguliert. Die Kostimulationen mit NfMLP führen zu einer signifikanten Abnahme, der Transkriptionsrate. Die Kostimulation mit PMA und PKC412 reguliert nach 6 und 16 signifikant herab. Bei der Kostimulation mit Bryostatin 1 und G66850 kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression zu beiden Zeitpunkten. G66850 und G66976 alleine bewirken eine Herabregulierung. Bemerkenswert ist die hochsignifikante Heraufregulierung der Expression von PKC  $\theta$  durch den Cytokinmix, die auch in allen Kostimulationen signifikant bleibt. Die einzelnen Interleukine führen zu keiner signifikanten Veränderung der Transkriptionsrate.

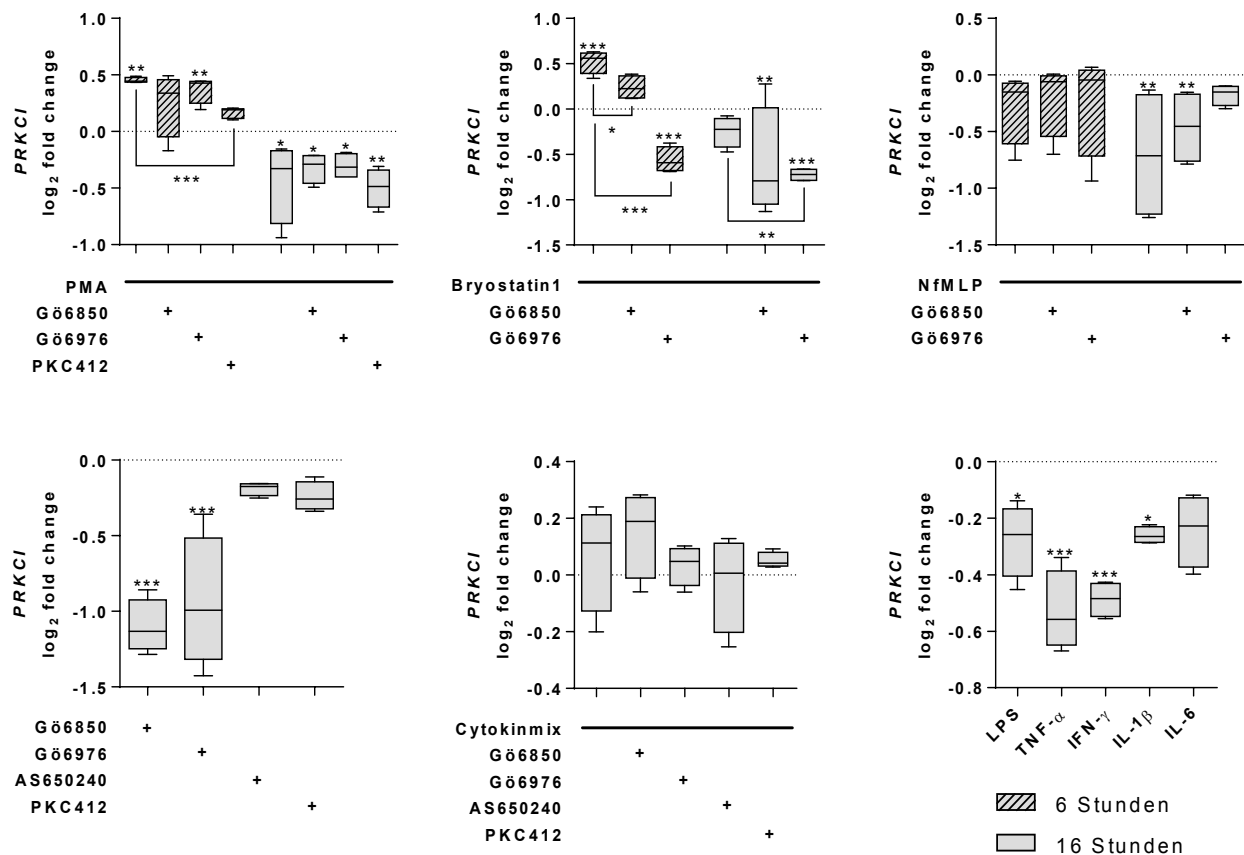


**Abbildung 25** stellt die Expressionsänderungen der PKC  $\zeta$  nach Stimulation dar.

**Abbildung 25: Genexpressionsanalyse der atypischen PRKCZ nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von PRKCZ in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, G66850 200 nmol/l, G66976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

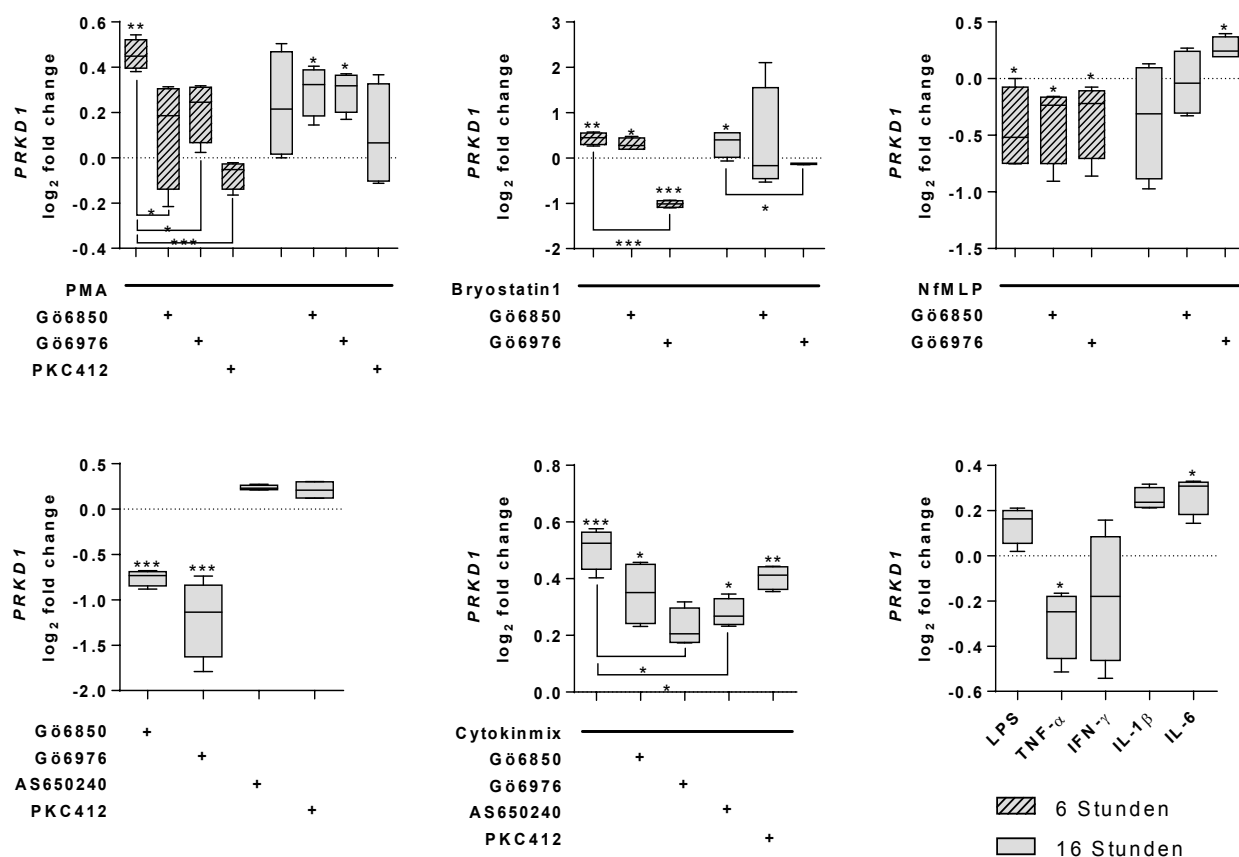
Die PKC  $\zeta$  reagiert ebenso wie die PKC  $\eta$  mit minimaler Änderung der Genexpression auf Stimulation. PMA, Bryostatin 1 und Cytokinmix haben keinen Einfluss auf die PKC  $\zeta$  Transkriptionsrate. Die PMA / PKC412 Kostimulation führt nach 16 Stunden im Vergleich zur PMA Behandlung zu einer Zunahme der Expression. Nach 6 stündiger Kostimulation mit Bryostatin 1 und G66976 nimmt die Expression im Vergleich zur Kontrolle und im Verhältnis zur alleinigen Bryostatin 1 Behandlung signifikant ab. Die Stimulation mit NfMLP führt zu signifikanter Abnahme der Transkriptionsrate nach 16 Stunden. Eine 16 stündige Inkubation mit G66850, G66976 und humanem TNF- $\alpha$  resultieren ebenso in einem signifikanten Rückgang der Expression von PKC  $\zeta$ . AS605240 und PKC412 alleine führen zu einem Anstieg der Expression.

**Abbildung 26** stellt die Expressionsänderungen der PKC  $\iota$  nach Stimulation dar.



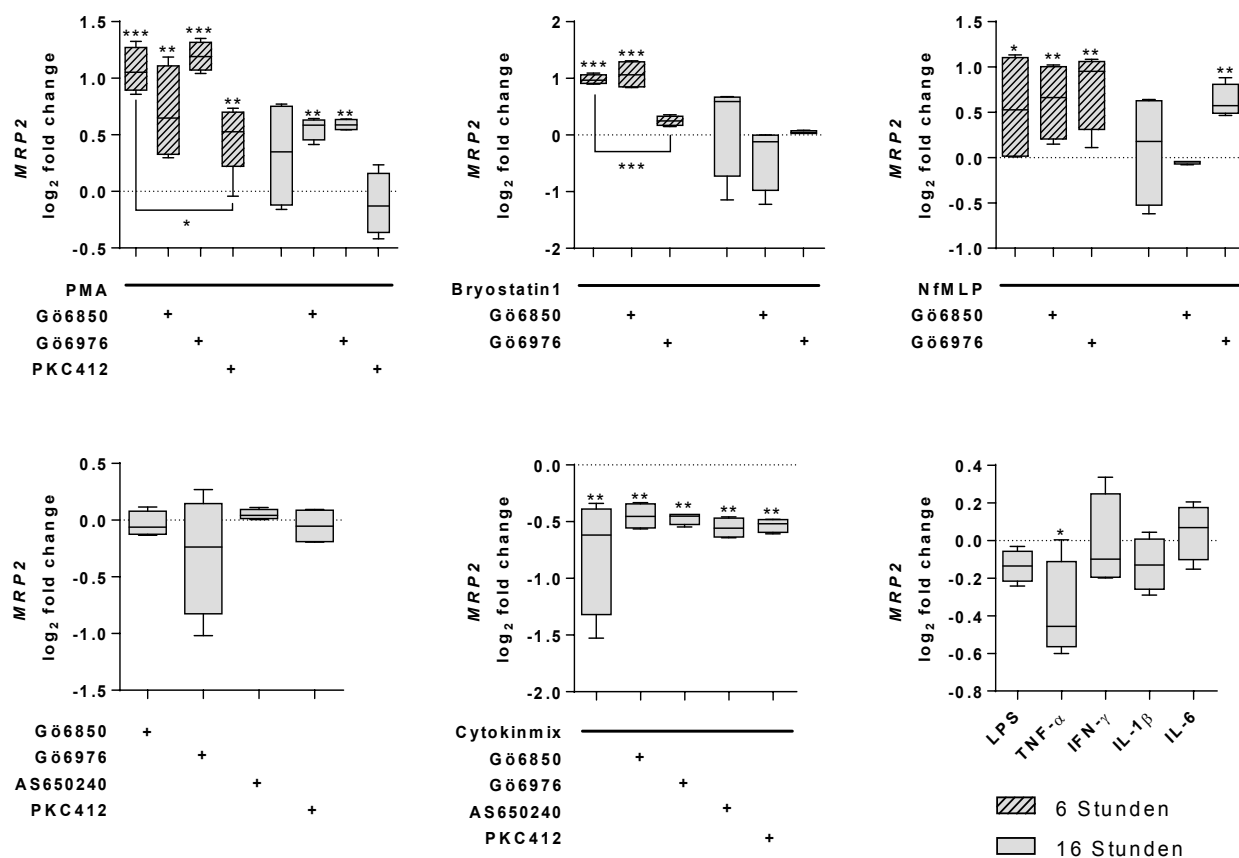
**Abbildung 26: Genexpressionsanalyse der atypischen *PRKCI* nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von *PRKCI* in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

Die Expressionsrate der PKC  $\iota$  ist nach 6 stündiger PMA-Stimulation erhöht. Die PKC-Inhibitoren Gö6850 und Gö6976 reduzieren diese Regulierung, im Gegensatz zu PKC412, nicht. Nach 16 Stunden resultiert die Stimulation mit PMA in einer signifikanten Herabregulierung. Bryostatin 1 führt nach 6 Stunden zu einer Hochregulierung, die durch Gö6850 und Gö6976 signifikant reduziert wird. Gö6976 beeinflusst die Expression nach 16 Stunden noch signifikant negativ. NfMLP reguliert die Expression nach 16 Stunden herab. Gö6850, Gö6976, senken die Transkriptionsrate ebenso signifikant wie LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ . Der Cytokinmix hat ebenso wie AS605240, PKC412 und IL-6 keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von PKC  $\iota$ .

**Abbildung 27** stellt die Expressionsänderungen der *PRKD1* nach Stimulation dar.

**Abbildung 27: Genexpressionsanalyse der atypischen *PRKD1* nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von *PRKD1* in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Wert dar. (\* : p-Wert ≤ 0,05; \*\* : p-Wert ≤ 0,01; \*\*\* : p-Wert ≤ 0,001)

Die Stimulation mit PMA führt nach 6 und 16 Stunden zu einer Steigerung der Expressionsrate von PKD1. Die Kostimulation mit PKC-Inhibitoren führt nach 6 Stunden zu einem signifikant geringeren Anstieg. Die Kostimulation mit PKC412 resultiert in einer Herabregulierung, die sich hochsignifikant von der alleinigen PMA-Stimulation unterscheidet. Bryostatin 1 erhöht die Transkriptionsrate ebenso nach 6 und 16 Stunden. Nach 6 Stunden reduziert nur Gö6976 die Expression signifikant, nach 16 Stunden beide PKC-Inhibitoren, jedoch nur Gö6976 signifikant. NfMLP senkt die Transkriptionsrate und beeinflusst nur in Kombination mit Gö6976 nach 16 Stunden die Expression signifikant positiv. Der Cytokinmix hat einen signifikanten steigernden Einfluss auf die Expression von PKD1. Die Kostimulation mit Inhibitoren reduziert diese Heraufregulierung. Gö6850, Gö6976, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  senken die Transkriptionsrate.

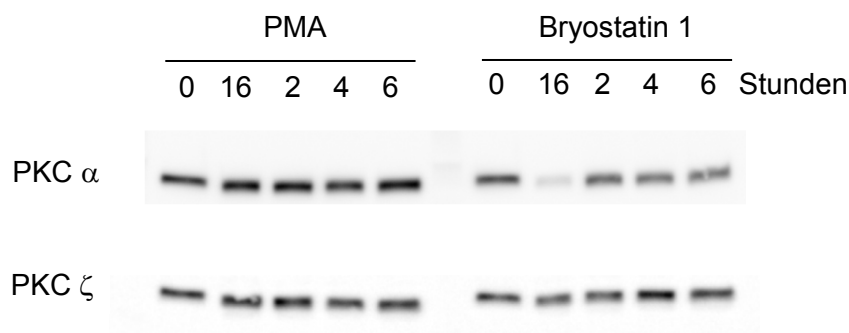
**Abbildung 28** stellt die Expressionsänderungen von MRP2 nach Stimulation dar.

**Abbildung 28: Genexpressionsanalyse des kanalikulären Transportproteins MRP2 nach Stimulation.** Änderung der Transkriptionsrate ( $\log_2$  fold change) von MRP2 in HepaRG-Zellen nach 6 Stunden (schraffiert) und nach 16 Stunden relativ zum Expressionswert der unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenztranskript HMBS. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, NfMLP 100 nmol/l, G66850 200 nmol/l, G66976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS650240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker stellen minimale und maximale Werte dar. (\* : p-Wert ≤ 0,05; \*\* : p-Wert ≤ 0,01; \*\*\* : p-Wert ≤ 0,001)

Die Expression des kanalikulären Transporters MRP2 wird durch die in den Stimulationsversuchen verwendeten Substanzen signifikant reguliert. PMA führt nach 6 und 16 Stunden zu einer Hochregulierung. Die Kostimulation mit PKC412 reduziert die Expression nach 6 Stunden signifikant und nach 16 Stunden auf Kontrollniveau. 6-stündige Bryostatin 1 Behandlung resultiert in einer Heraufregulierung. G66976 verringert diese signifikant. Nach 16 Stunden finden sich im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede. Die NfMLP-Gruppen sind nach 6 Stunden hochreguliert, erreichen nach 16 Stunden aber, bis auf die Kostimulation mit G66976, kein Signifikanzniveau mehr. TNF- $\alpha$  und der Cytokinmix beeinflussen die Transkription signifikant negativ, die Kostimulationen verhindern dies nicht. Die Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Expression von MRP2.

### 4.3 Westernblot der PKC $\alpha$ und $\zeta$ in HepaRG-Zellen nach Stimulation mit PMA und Bryostatin 1

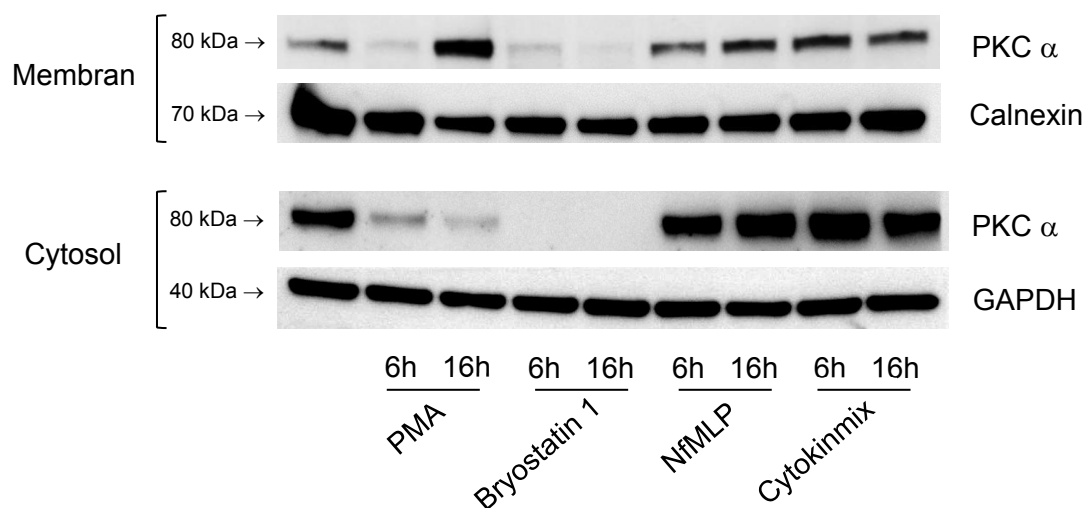
Der Westernblot wurde angewendet, um die klassische PKC  $\alpha$  und die atypische PKC  $\zeta$  auf Proteinebene in HepaRG-Zellen nachzuweisen. **Abbildung 29** zeigt zum Zeitpunkt 0 für beide Proteinkinasen eine Bande im Totallysate. Diese sprechen für eine basale Expression der beiden Kinasen in HepaRG-Zellen. Die anschließend durchgeführte Stimulation mit 100nm PMA über 16 Stunden führt auf Proteinebene weder für PKC  $\alpha$  noch für PKC  $\zeta$  zu einer Veränderung; die Proteinmenge bleibt über einen Zeitraum von 16 Stunden konstant. Die Stimulation von HepaRG-Zellen mit 100nmol/l Bryostatin 1 führt hingegen nach 16 Stunden zu einer deutlichen Abnahme der Proteinmenge von PKC  $\alpha$ . Auf die Expression von PKC  $\zeta$  hat Bryostatin 1 keinen Einfluss, es findet sich weder eine Reduktion noch eine Zunahme der Bandenintensität.



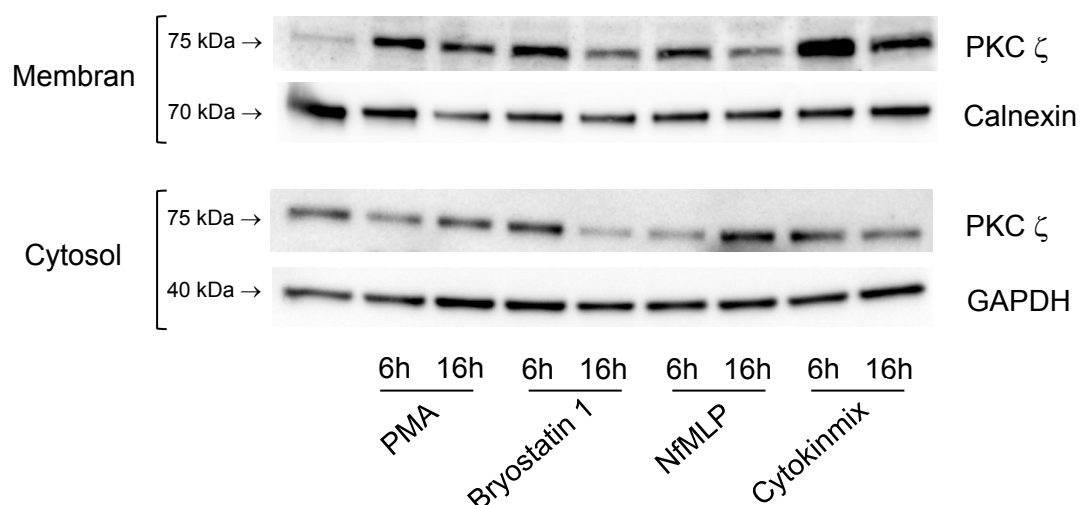
**Abbildung 29: Westernblot der PKC  $\alpha$  und PKC  $\zeta$  basal und nach Stimulation mit PKC-Aktivatoren in HepaRG-Zellen.** Die Banden zeigen die Expression der Kinasen auf Proteinebene.

#### 4.4 Translokation der PKC $\alpha$ und $\zeta$ nach Stimulation-Analyse der Zellkompartimente

Die Fraktionierung der HepaRG-Zellen erlaubte eine genauere Analyse der cytosolischen und membranären Zellkompartimente in Bezug auf Lokalisation und Quantifizierung der Proteinkinasen. **Abbildung 30** und **Abbildung 31** zeigen exemplarisch die Auswertung der Westernblots. Die Banden erschienen in der für sie in der Literatur typisch beschriebenen Höhe und entsprachen in etwa ihrem jeweiligen Molekulargewicht. In der cytosolischen Fraktion diente GAPDH, in der membranären Fraktion Calnexin als Ladekontrolle [86]. GAPDH konnte in der membranären Fraktion nicht nachgewiesen werden. Der Stichprobenumfang für die densitometrische Analyse der Banden betrug vier für jede Gruppe. Die Daten der Auswertung finden sich tabellarisch im Anhang.

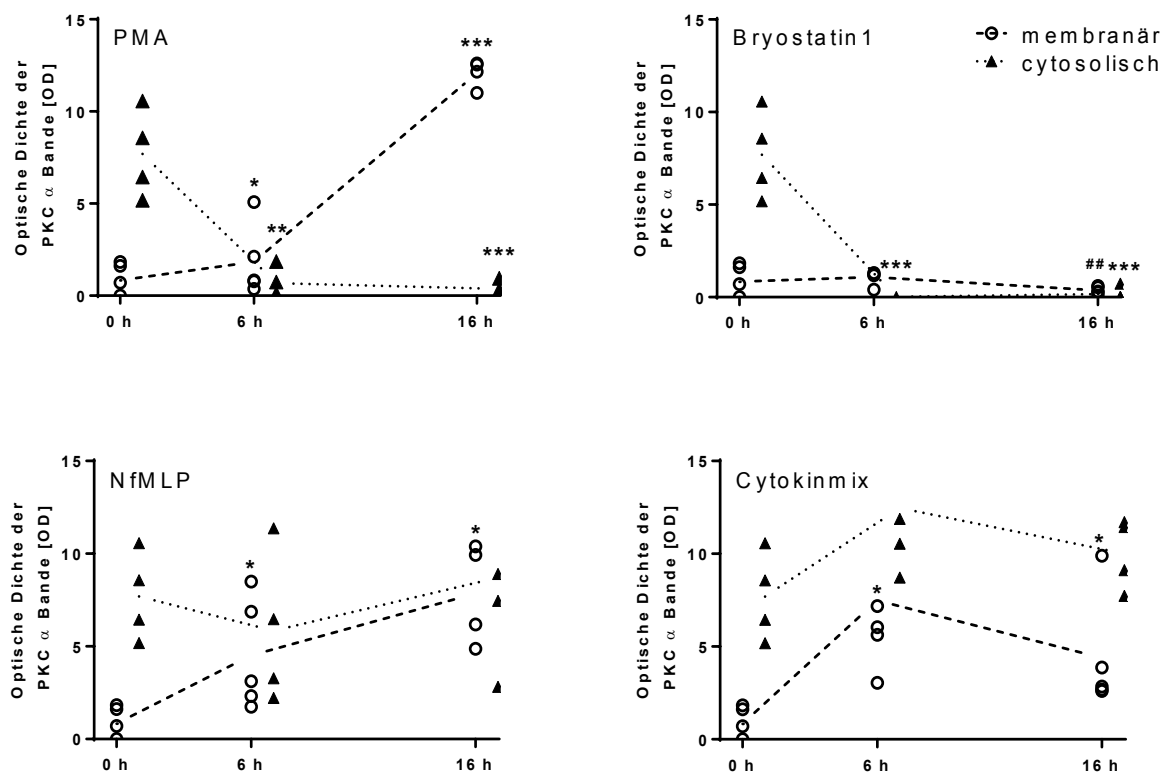


**Abbildung 30: Repräsentativer Westernblot der PKC  $\alpha$  in HepaRG-Zellen nach Stimulation mit PKC-Aktivatoren.** Konzentrationen= PMA 500 nmol/l, Bryostatin 1 500nmol/l, NfMLP 500nmol/l, Cytokinmix (100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ )



**Abbildung 31: Repräsentativer Westernblot der PKC  $\zeta$  in HepaRG-Zellen nach Stimulation mit PKC-Aktivatoren.** Konzentrationen= PMA 500 nmol/l, Bryostatin 1 500nmol/l, NfMLP 500nmol/l, Cytokinmix (100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ )

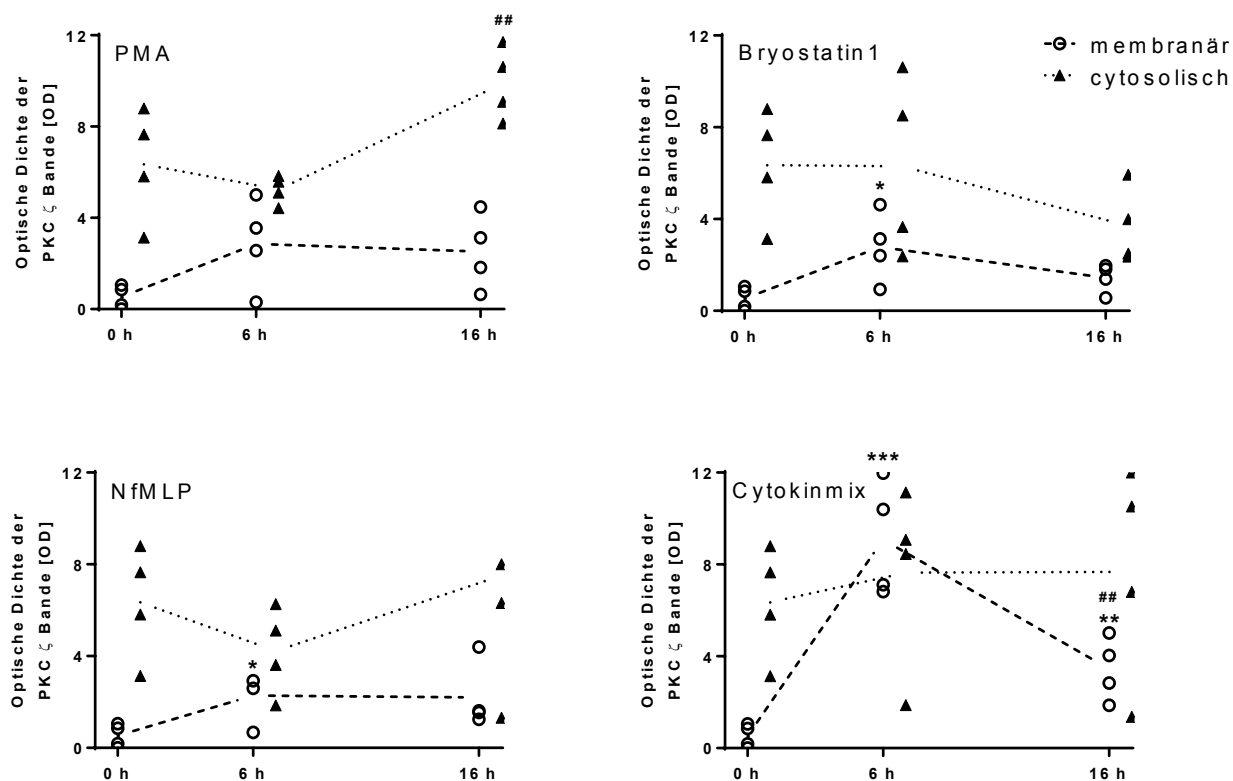
In **Abbildung 32** ist die Regulierung der Proteinexpression von PKC  $\alpha$  durch die Aktivatoren intrazellulärer Signalwege dargestellt.



**Abbildung 32: Densitometrische Auswertung der PKC  $\alpha$  Banden.** Dargestellt sind Änderungen in der Proteinexpression der PKC  $\alpha$  nach Stimulation, ermittelt anhand der Optischen Dichte von vier Banden. Konzentrationen= PMA 500 nmol/l, Bryostatin 1 500nmol/l, NfMLP 500nmol/l, Cytokinmix (100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ). n=4. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur 6 Stunden Gruppe. \*, # : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*, ## : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\*, ### : p-Wert  $\leq 0,001$ )

Die Stimulation mit PMA führt im Cytosol von HepaRG-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der PKC  $\alpha$ . An der Membran kommt es dagegen schon 6 Stunden nach PMA-Stimulation zu einer Aktivierung der Proteinkinase, nach 16 Stunden ist diese Ansammlung hochsignifikant. Bryostatin 1 führt in der cytosolischen Fraktion ebenso zu einer signifikanten Herabregulierung; an der Membran allerdings nur kurzfristig zu einer Zunahme der PKC  $\alpha$ . Nach 16 Stunden ist diese im Vergleich zum 6 Stunden Zeitpunkt signifikant reduziert. Der PI3K $\gamma$  Aktivator NfMLP verringert die PKC  $\alpha$  intrazellulär nach 6 Stunden, nach 16 Stunden ist eine steigende Proteinexpression zu verzeichnen. An der Membran kommt es 6 und 16 Stunden nach NfMLP-Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der PKC  $\alpha$ . Die Stimulation mit dem Cytokinmix führt in beiden Zellfraktionen bereits nach 6 Stunden zu einer steilen Zunahme der Proteinkinase.

**Abbildung 33** zeigt die Regulierung der atypischen Proteinkinase-C  $\zeta$ .



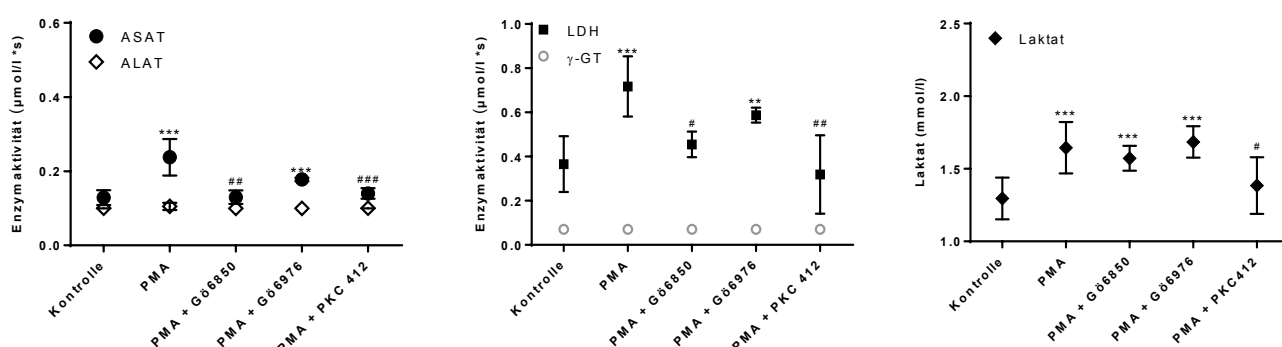
**Abbildung 33: Densitometrische Auswertung der PKC  $\zeta$  Banden.** Dargestellt sind Änderungen in der Proteinexpression der PKC  $\zeta$  nach Stimulation, ermittelt anhand der Optischen Dichte von vier Banden. Konzentrationen= PMA 500 nmol/l, Bryostatin 1 500nmol/l, NfMLP 500nmol/l, Cytokininmix (100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ). n=4. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur 6 Stunden Gruppe. \*, # : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*, ## : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\*, ### : p-Wert  $\leq 0,001$ )

Nach der Stimulation mit PMA nimmt cytosolisch die Proteinmenge nach 6 Stunden ab und nach 16 Stunden signifikant zu. An der Membran ist nach 6 und 16 Stunden eine nicht-signifikante Zunahme zu erkennen. Bryostatin 1 führt im Cytosol zu einer Verringerung der Proteinexpression. An der Membran ist nach 6 Stunden eine signifikante Zunahme von PKC  $\zeta$  nach 16 Stunden eine Abnahme zu verzeichnen. NfMLP hat auf die PKC  $\zeta$  einen ähnlichen, wenn auch nicht ganz so deutlichen Einfluss wie auf die PKC  $\alpha$ . Einer kurzfristigen Abnahme im Cytosol folgt eine Zunahme nach 16 Stunden. An der Membran bleibt die Zunahme der Proteinkinase über den gesamten Zeitraum erhalten. Der Cytokininmix hat auf die cytosolische Verteilung von PKC  $\zeta$  wenig Einfluss. Die membranäre Fraktion jedoch zeigt eine hochsignifikante Ansammlung der Kinase.



### 4.5 Effekte der Stimulation auf die Integritätsparameter der Leber

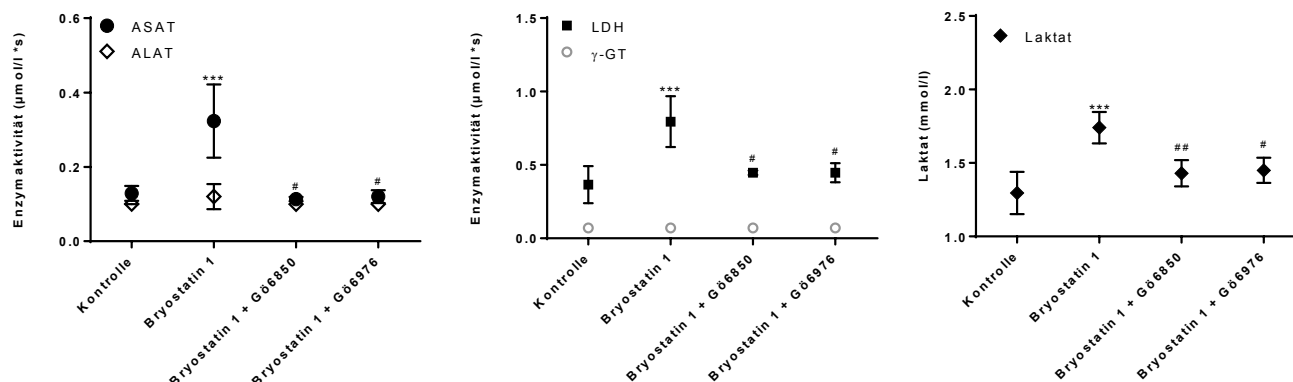
In der Klinischen Chemie wurden während und nach den Stimulationsversuchen die Konzentrationen der Leberenzyme ALAT, ASAT, LDH,  $\gamma$ -GT und Laktat im Überstand gemessen. Werte der Enzyme ASAT und ALAT  $<0,1 \mu\text{mol} / \text{l} \cdot \text{s}$  konnten nicht detektiert werden.  $\gamma$ -GT wurde in keiner Probe detektiert; alle Werte waren  $<0,07 \mu\text{mol} / \text{l} \cdot \text{s}$  und damit unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Tabelle mit Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen sowie den p-Werten ist angehängt. **Abbildung 34** stellt die Auswertung der paraklinischen Messungen nach PMA- und Kostimulation dar.



**Abbildung 34: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit PMA.** Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l. n=5. Mittelwerte mit Standardabweichung. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur PMA Gruppe. \*, # : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*, ## : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\*, ### : p-Wert  $\leq 0,001$ )

PMA führt zu einer Erhöhung der Werte von ASAT, LDH und Laktat. Die Kostimulation von PMA und Gö6850 führt zu einer signifikanten Verminderung der Werte von ASAT und LDH. Die Kostimulation von PMA und PKC412 führt bei ASAT, LDH und Laktat zu einer signifikanten Reduktion der Werte. ALAT und  $\gamma$ -GT zeigen keine Veränderung nach Stimulation.

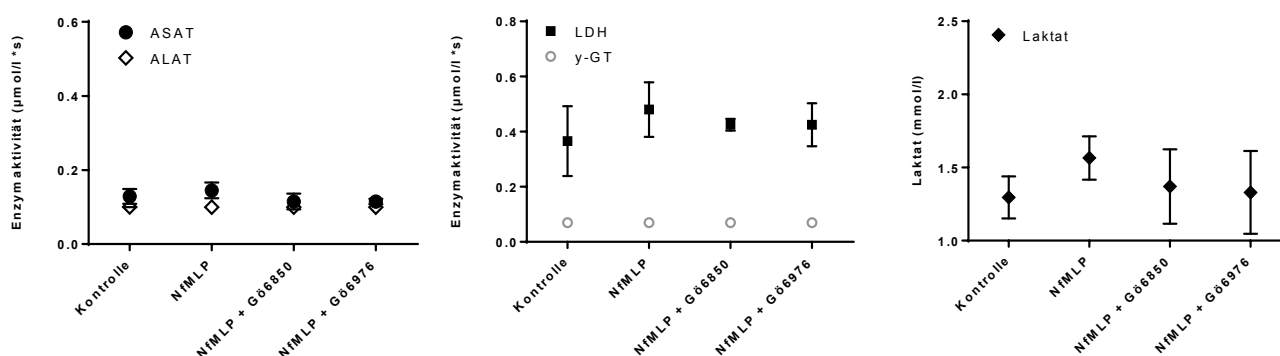
**Abbildung 35** stellt die Auswertung der paraklinischen Werte nach Bryostatin 1- und Kostimulation dar.



**Abbildung 35: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit Bryostatin 1.** Konzentrationen= Bryostatin 1 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l. n=5. Mittelwerte mit Standardabweichung. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur Bryostatin 1 Gruppe. \*, # : p-Wert ≤ 0,05; \*\*, ## : p-Wert ≤ 0,01; \*\*\*, ### : p-Wert ≤ 0,001)

Bryostatin 1 führt zu einer Erhöhung der Werte von ASAT, LDH und Laktat. Die Kostimulation von Bryostatin 1 und den PKC-Inhibitoren Gö6850 und Gö6976 führt zu einer signifikanten Verminderung der Werte von ASAT und LDH und Laktat. ALAT und  $\gamma$ -GT zeigen keine Veränderung nach Stimulation.

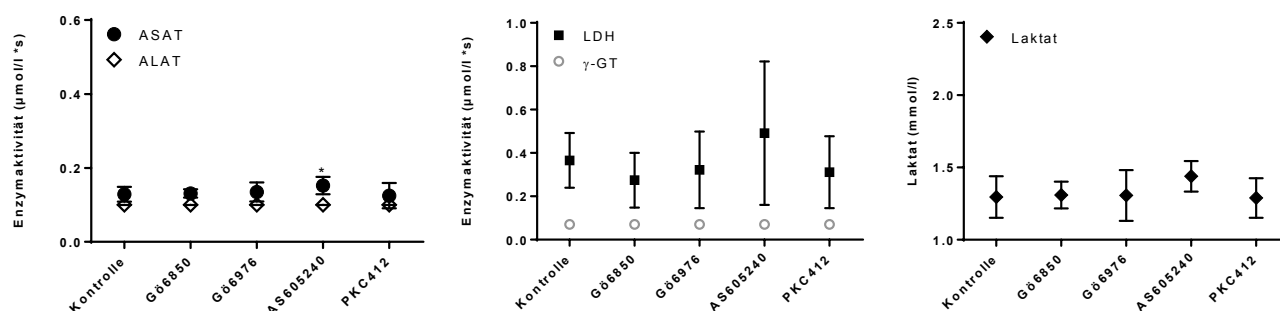
**Abbildung 36** stellt die Auswertung der paraklinischen Werte nach NfMLP- und Kostimulation dar.



**Abbildung 36: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit NfMLP.** Konzentrationen= NfMLP 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l. n=5. Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die Leberenzyme ASAT, ALAT, LDH und  $\gamma$ -GT zeigen keine Veränderung nach Stimulation mit NfMLP. Die Laktatwerte nach Stimulation mit NfMLP zeigen ebenso keine signifikante Erhöhung.

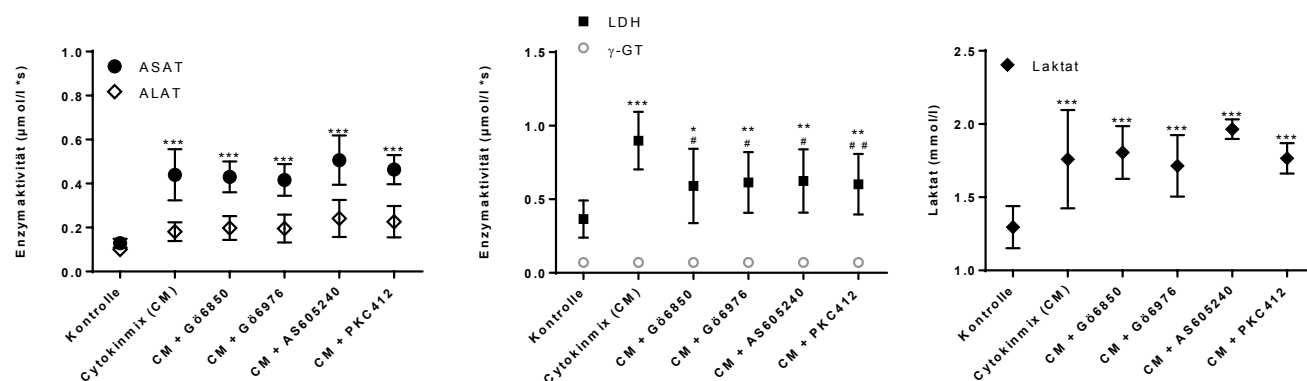
**Abbildung 37** stellt die Auswertung der paraklinischen Werte nach Stimulation mit PKC-Inhibitoren dar.



**Abbildung 37: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit PKC-Inhibitoren.** Konzentrationen= Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l. n=5. Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die Stimulation von HepaRG-Zellen lediglich mit PKC-Inhibitoren zeigt bis auf eine Erhöhung der ASAT Werte unter Stimulation mit AS605240 keine signifikanten Effekte auf die untersuchten Parameter.

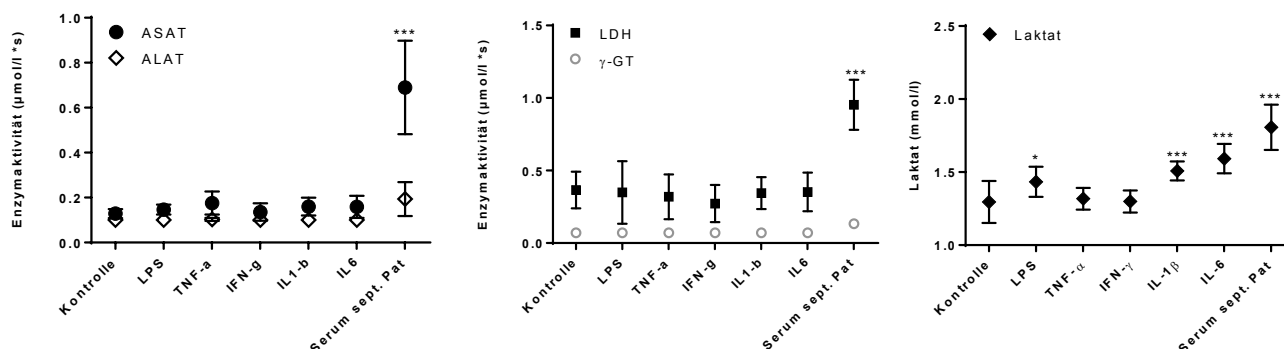
**Abbildung 38** stellt die Auswertung der paraklinischen Werte nach Cytokinmix-Stimulation dar.



**Abbildung 38: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit Cytokinmix.** Konzentrationen= Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, CM = Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ). n=5. Mittelwerte mit Standardabweichung. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle; # : Signifikanz im Vergleich zur Cytokinmix Gruppe. \* , # : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* , ## : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* , ### : p-Wert  $\leq 0,001$ )

Der Cytokinmix führt bei allen gemessenen Parametern zu erhöhten Werten. Ein signifikanter Anstieg ist bei ASAT, LDH und Laktat zu verzeichnen. Die Kostimulation von Cytokinmix und PKC-Inhibitoren führt zu einer signifikanten Reduktion der erhöhten LDH Werte.

**Abbildung 39** stellt die Auswertung der paraklinischen Werte nach Stimulation mit den einzelnen Cytokinen dar.

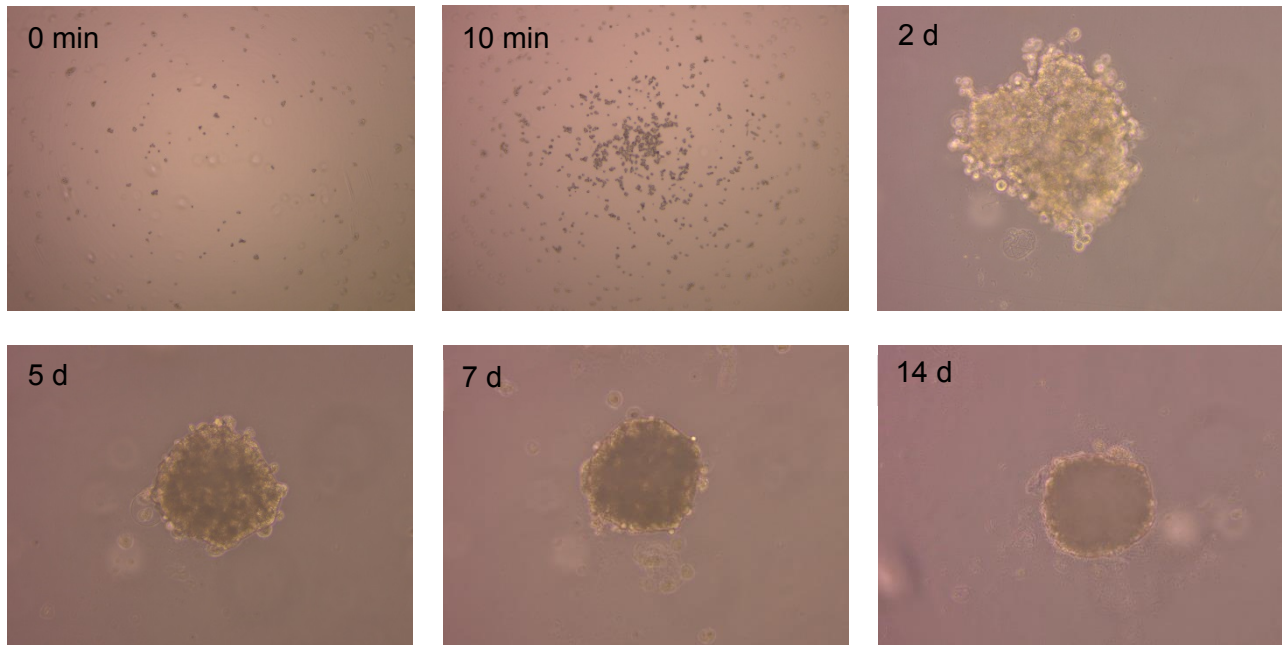


**Abbildung 39: Analyse der Leberenzyme aus dem Überstand nach Stimulation von HepaRG-Zellen mit einzelnen Interleukinen des Cytokinmixes und Serum vom septischen Patienten.** Konzentrationen= LPS 100 ng/ml, TNF-α 50 ng/ml, IFN-γ 10 ng/ml, IL-1β 10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Mittelwerte mit Standardabweichung. (\* : Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle. \* : p-Wert ≤ 0,05; \*\* : p-Wert ≤ 0,01; \*\*\* : p-Wert ≤ 0,001)

Die Leberenzyme erfahren durch die Stimulation mit den Interleukinen teilweise signifikante Änderungen. LPS, IL-1β und IL-6 führen zu signifikant erhöhten Laktat Werten. Die proinflammatorischen Cytokine TNF-α und IL-1β führen zu einer Zunahme der ASAT. Die Stimulation mit Serum vom septischen Patienten resultiert in signifikant erhöhten Werten von ASAT, LDH und Laktat. ALAT und γ-GT zeigen nicht-signifikant erhöhte Werte.

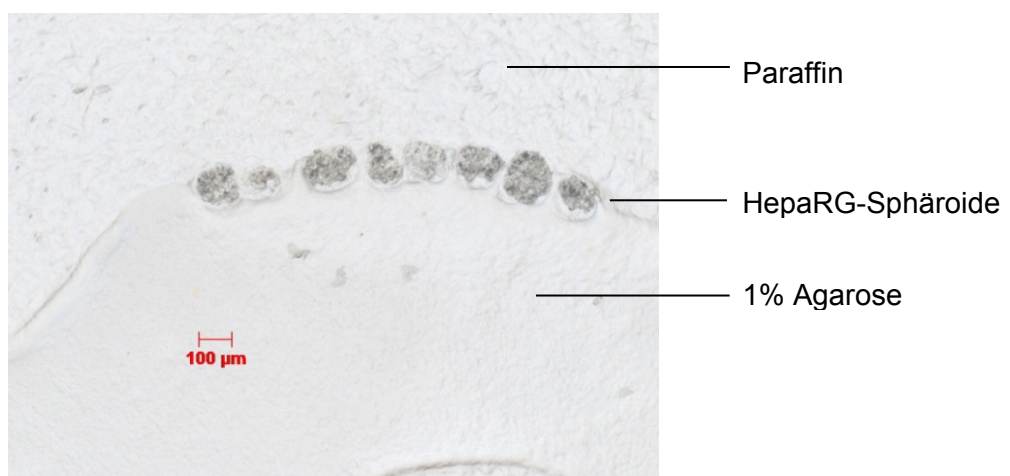
### 4.6 Strukturanalyse der 3D-Zellkultur - HepaRG-Sphäroide

**Abbildung 40** zeigt die Formation eines HepaRG-Sphäroids im Zeitverlauf über 14 Tage. Das Bild von Tag 14 zeigt die angestrebte, kompakte Struktur.



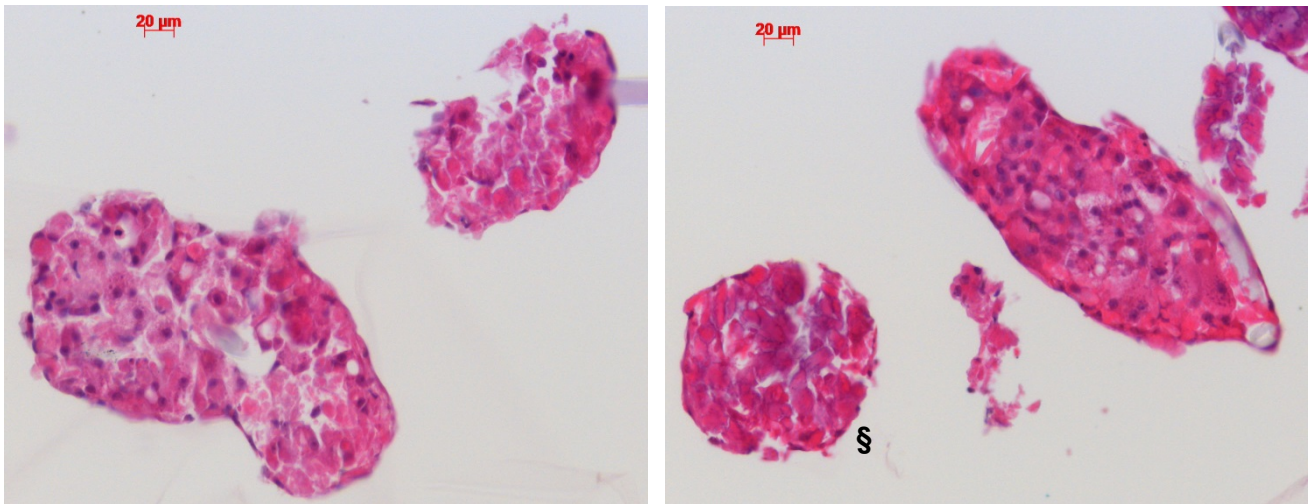
**Abbildung 40: Lichtmikroskopische Darstellung der Formation von HepaRG-Sphäroiden.** 2000 differenzierte Zellen formen über einen Zeitraum von 14 Tagen eine kompakte Struktur. Vergrößerung 20x Objektiv Lichtmikroskop Primo-Vert.

Nach Verarbeitung der HepaRG-Sphäroide (Kapitel 3.5.1) wurden die Schnitte vor der Färbung unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. **Abbildung 41** zeigt die sich in Agarose eingebetteten, mit Paraffin eingedeckten Sphäroide (Tag 14).



**Abbildung 41: 8 HepaRG-Sphäroide (Tag 14) in einem Agarose Kegel, eingedeckt mit Paraffin.** Lichtmikroskopische Aufnahme eines 3 µm Schnittes. Die Sphäroide haben einen Durchmesser von circa 100µm. Vergrößerung 20 x Objektiv.

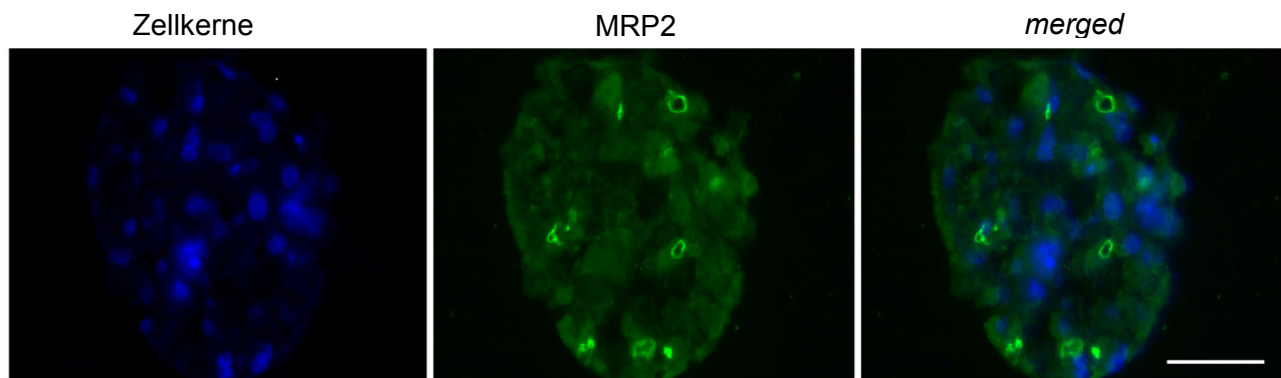
Um einen Eindruck von der Morphologie der HepaRG-Sphäroide zu erhalten, wurden diese HE übersichtsgefärbt. **Abbildung 42** zeigt vier HE gefärbte Sphäroide. Auf der Außenseite der Sphäroide bilden sich flache, epitheliale Strukturen aus. Innerhalb des HepaRG-Sphäroids sind teilweise ausgereifte Hepatozyten zu erkennen. Diese formen einen diskontinuierlichen Zellverband. Zwischen den Parenchymzellen lassen sich kanalikuläre Lumina identifizieren, die für eine Entwicklung von gallengangsähnlichen Strukturen sprechen.



**Abbildung 42: HE gefärbte HepaRG-Sphäroide.** Drei Sphäroide zeigen erkennbare Gewebestrukturen (Zellkerne und Cytoplasma). Der mit § gekennzeichnete Sphäroid zeigt einen diffusen Verlust aller Zellkerne und ein Überwiegen der basischen Zellbestandteile (Kollagen, Keratin und Zellplasmaproteine). Vergrößerung 40x Objektiv.

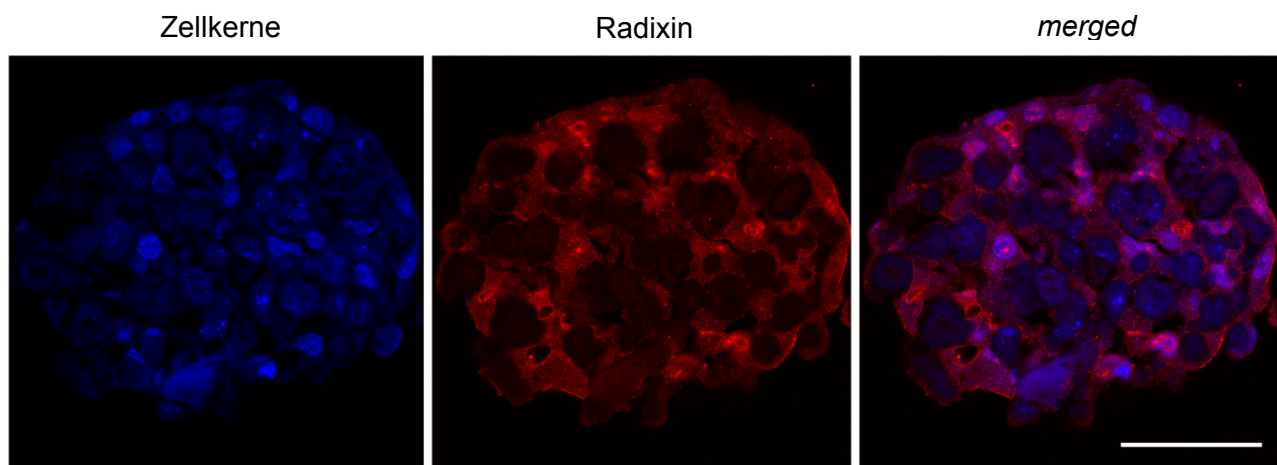
### 4.6.1 MRP2 und Radixin - Zellmorphologie in HepaRG-Sphäroiden

**Abbildung 43** zeigt einen, mit dem Mikrotom geschnittenen und MRP2-Fluoreszenzgefärbten HepaRG-Sphäroid. Die Lumina im parenchymalen Zellverband der Sphäroide, die in der HE Färbung als gallengangsähnliche Strukturen bewertet wurden, können mit der Immunfluoreszenzfärbung als MRP2-positive, stark fluoreszierende, kreisförmige Strukturen nachgewiesen werden.



**Abbildung 43: Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von MRP2 in einem HepaRG-Sphäroid.** Der blaue Kanal zeigt die Zellkernfärbung mit DAPI. Der grüne Kanal zeigt die MRP2-Färbung mit AF 568. Das dritte Bild zeigt eine Überlagerung der Kanäle. Maßstabsbalken=50  $\mu$ m. Vergrößerung 40x Objektiv LSM780.

**Abbildung 44** zeigt ein Radixin-gefärbtes HepaRG-Sphäroid. Die Radixin Färbung der Sphäroide zeigt eine Lokalisation vermehrt an der Membran aber auch diffus intrazellulär. An den runden gallenkanalähnlichen Strukturen, die in der MRP2-Färbung positiv waren, ist auch eine höhere Fluoreszenzintensität von Radixin zu verzeichnen.

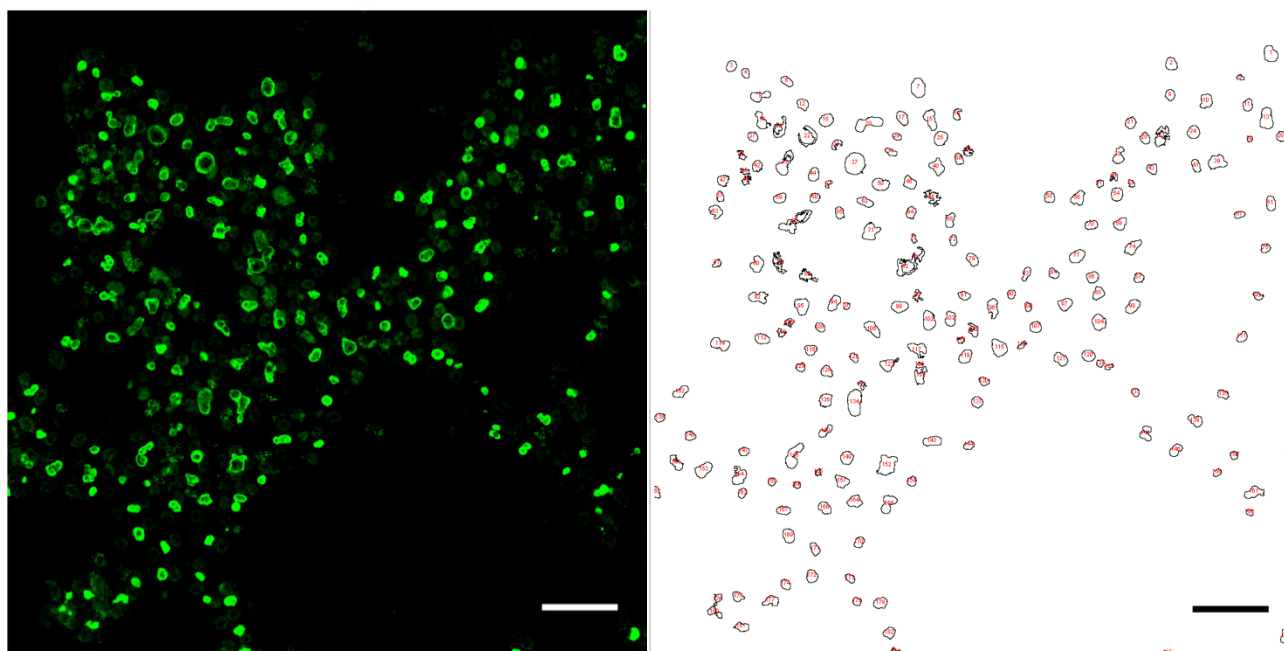


**Abbildung 44: Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von Radixin in einem HepaRG-Sphäroid.** Der blaue Kanal zeigt die Zellkernfärbung mit DAPI. Der rote Kanal zeigt die MRP2-Färbung mit AF 568. Das dritte Bild zeigt eine Überlagerung der Kanäle. Maßstabsbalken=50  $\mu$ m. Vergrößerung 40x Objektiv LSM780.



### 4.7 MRP2-Immunfluoreszenz in HepaRG-Monolayer Zellkulturen

Die Fluoreszenzintensität, ermittelt als Menge des emittierten Lichts, kann als Parameter analysiert werden: Anhand unterschiedlicher Auswertungen des Fluoreszenzsignals konnten Rückschlüsse auf die Lokalisation, die Quantität und die Funktionalität von MRP2 geschlossen werden. Der Fokus der Immunhistochemie lag in dieser Arbeit auf der Phänotypisierung des kanalikulären Transportproteins MRP2. **Tabelle 9** stellt die Auswertung des in **Abbildung 45** gezeigten Bildes dar.



**Abbildung 45: Darstellung einer Auswertung von MRP2-gefärbten HepaRG-Zellen mit ImageJ.** Grün = AF568 markiertes MRP2. Der Grenzwert für die Fluoreszenzintensität wurde von 50 bis 255 gesetzt. Fluoreszenzintensitäten < 50 wurden als Hintergrund gewertet. Die Umrandungen zeigen die analysierten Partikel. Maßstabsbalken=50 µm. Vergrößerung 20x Objektiv LSM780.

Die **Tabelle 9** zeigt 181 gewertete Partikel (gallenkanalähnliche Strukturen) mit einer Gesamtoberfläche von  $7.423.689 \mu\text{m}^2$ , die für die Auswertung berücksichtigt wurden. Dies entspricht 4% der Gesamtoberfläche des angefertigten Bildes. Der Wert der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität liegt aufgrund des gewählten Grenzwertes zwischen 50 bis 255. Durchschnittlich hat jede gewertete Struktur eine Fluoreszenzintensität von 98,939 AU.



<i>Count</i>	<i>Area</i>	<i>Mean</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>IntDen</i>
1	70.657	122.720	56	255	8.671.053
2	48.426	107.043	56	187	5.183.675

Zeilen 3 bis 179 sind der Übersicht halber nicht dargestellt

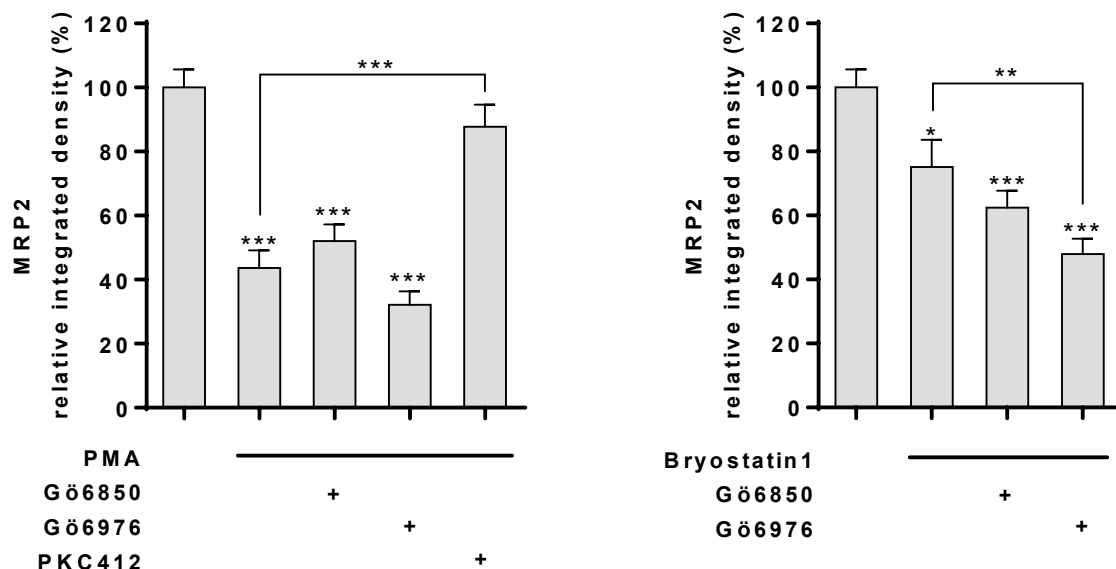
180	32.744	90.416	56	203	2.960.549
181	38.775	106.827	56	206	4.142.252

<i>Total Count</i>	<i>Total Area</i>	<i>Mean</i>			<i>IntDen</i>
181	7.423.689	98.939			3.919.011

**Tabelle 9: Beispielhafte Darstellung der ImageJ Analyse eines Bildes mit MRP2-gefärbten HepaRG-Zellen.** *Count*=gewertete Partikel, *Area*=Fläche in  $\mu\text{m}^2$ , *Mean*=durchschnittliche Fluoreszenzintensität, *Min*=minimale Intensität des Partikels, *Max*=maximale Intensität des Partikels, *IntDen*=*Integrated Density* (berechnete Einheit; entspricht dem Produkt aus *Area* und *Mean*).

## 4.7.1 Effekte der Stimulation von HepaRG-Zellen auf die Lokalisation von MRP2

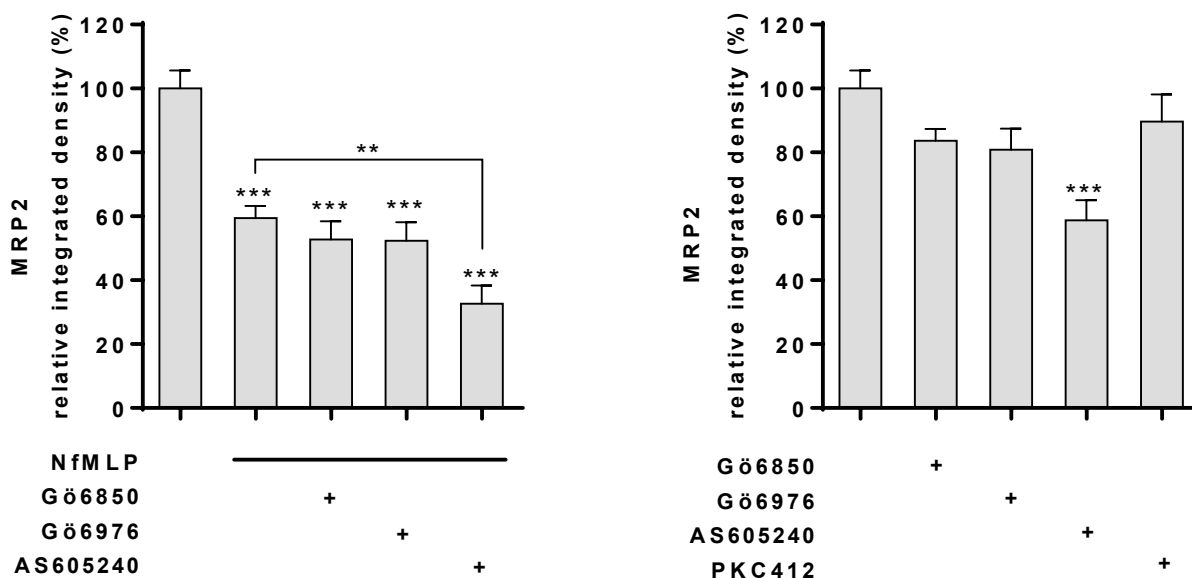
Im Folgenden sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz von MRP2 nach Stimulation dargestellt. Für jede Gruppe wurden fünf biologische Replikate produziert, von denen jeweils fünf repräsentative Fotos ausgewertet wurden. Im Anhang findet sich eine Tabelle mit Darstellung der Mittelwerte, Standardfehlern sowie den p-Werten. **Abbildung 46** stellt die Fluoreszenzdichte von MRP2 nach Stimulation mit PMA und Bryostatin dar.



**Abbildung 46: Integrated Density von MRP2 nach Stimulation mit PMA und Bryostatin 1.** Dargestellt ist die *Integrated Density* (fluoreszierende Fläche in  $\mu\text{m}^2$  \* durchschnittliche Fluoreszenzintensität) in HepaRG-Zellen nach 16 Stunden, relativ zur Kontrolle. Konzentrationen = PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, n=5. Mittelwerte mit Standardfehler. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

PMA führt zu einer signifikanten Reduktion der detektierbaren Fluoreszenz ( $p < 0,0001$ ). Die simultane Stimulation mit PMA und Gö6850 führt zu nicht signifikant höheren Werten ( $p = 0,2933$ ) mit PMA und Gö6976 zu nicht signifikant niedrigeren Werten ( $p = 0,1501$ ). Die Kostimulation mit PKC412 führt hingegen zu einer signifikanten Signalerhöhung der MRP2-gefärbten Immunkomplexe ( $p = 0,0001$ ). Bryostatin 1 führt, wie PMA, zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität ( $p = 0,0232$ ). Im Gegensatz zur PMA behandelten Gruppe resultiert die Kostimulation mit den PKC-Inhibitoren in einem weiteren Rückgang von fluoreszierendem MRP2. (Gö6850,  $p = 0,0001$ ; Gö6976,  $p < 0,0001$ ). Diese Minderung ist mit Gö6976 sogar im Verhältnis zu Bryostatin 1 signifikant ( $p = 0,0054$ ).

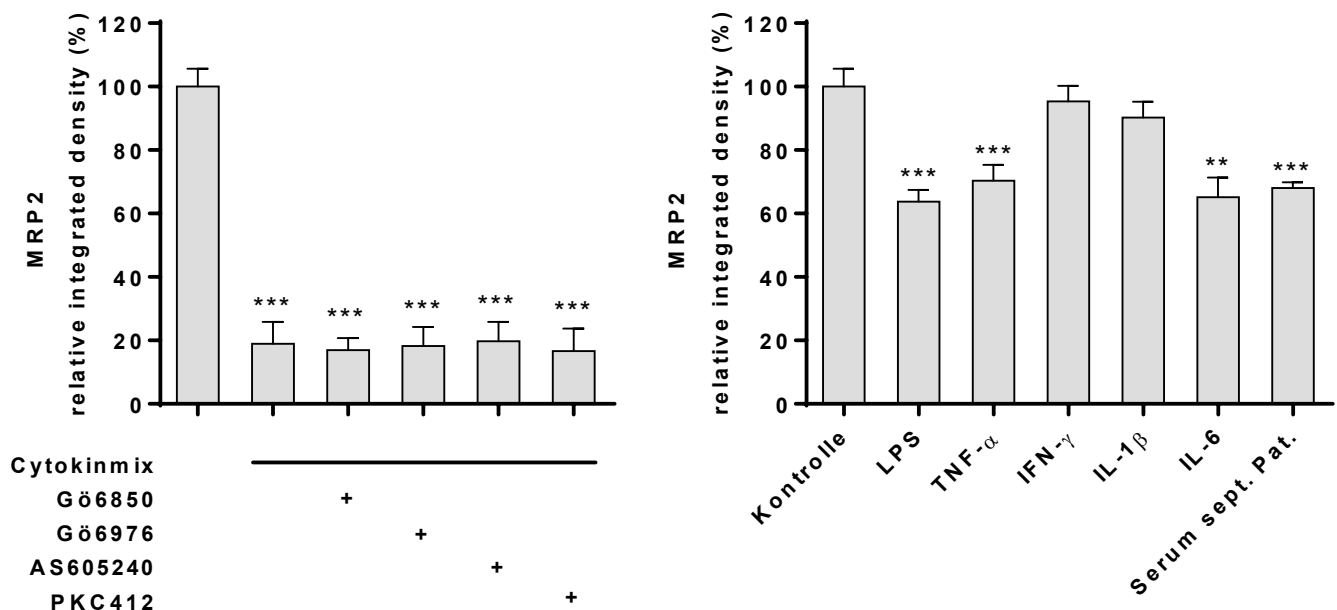
**Abbildung 47** stellt die Fluoreszenzdichte von MRP2 nach Stimulation mit NfMLP und PKC-Inhibitoren dar.



**Abbildung 47: Integrated Density von MRP2 nach Stimulation mit NfMLP und PKC-Inhibitoren.** Dargestellt ist die *Integrated Density* (fluoreszierende Fläche in  $\mu\text{m}^2$  \* durchschnittliche Fluoreszenzintensität) in HepaRG-Zellen nach 16 Stunden, relativ zur Kontrolle. Konzentrationen= NfMLP 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, n=5. Mittelwerte mit Standardfehler. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

NfMLP führt zu einer signifikanten Reduktion der ( $p < 0,0001$ ) der fluoreszierenden Immunkomplexe. Die gleichzeitige Behandlung mit den PKC-Inhibitoren bewirkt weder eine Zu- noch eine Abnahme. Im Verhältnis zu Kontrolle bleibt die Fluoreszenz signifikant reduziert (Gö6850  $p < 0,0001$ ; Gö6976  $p < 0,0001$ ). Unter Kostimulation mit AS650240 ( $p = 0,0012$ ) kommt es indes zu einer weiteren signifikanten Abnahme der Fluoreszenz. Die alleinige Stimulation mit Gö6850 ( $p = 0,0759$ ), Gö6976 ( $p = 0,0534$ ), PKC412 ( $p = 0,3332$ ) und AS650240 ( $p = 0,0008$ ) führt zwar zu einer leichten Reduktion des Fluoreszenzsignals, ist aber bis auf AS605240 nicht signifikant.

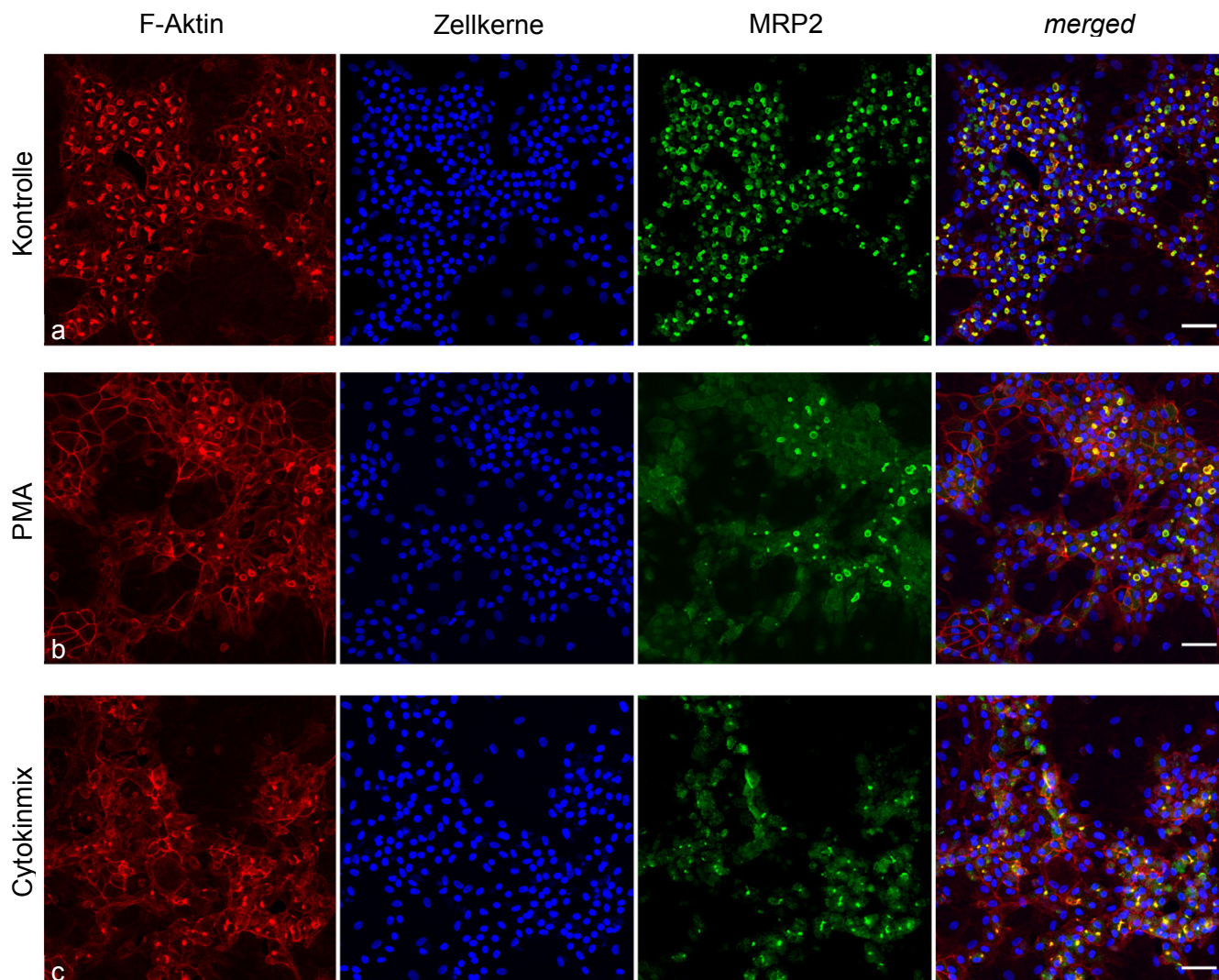
**Abbildung 48** stellt die Fluoreszenzdichte von MRP2 nach Stimulation mit dem Cytokinmix und Inhibitoren sowie einzelnen Cytokinen dar.



**Abbildung 48: Integrated Density von MRP2 nach Stimulation mit Cytokinmix und Interleukinen.** Dargestellt ist die *Integrated Density* (fluoreszierende Fläche in  $\mu\text{m}^2$  \* durchschnittliche Fluoreszenzintensität) in HepaRG-Zellen nach 16 Stunden relativ zur Kontrolle. Konzentrationen= Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, AS605240 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ) LPS 100ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml, IFN- $\gamma$  10 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml. n=5. Mittelwerte mit Standardfehler. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

Die Stimulation der HepaRG-Zellen mit dem Cytokinmix führt zu einem hochsignifikanten Abfall ( $p < 0,0001$ ) von fluoreszierenden MRP2-Immunkomplexen. Die gleichzeitige Behandlung mit Gö6850 ( $p < 0,0001$ ), Gö 6976 ( $p < 0,0001$ ), AS650240 ( $p < 0,0001$ ) und PKC412 ( $p < 0,0001$ ) kann diese Abnahme von MRP2 an der kanalikulären Membran nicht verhindern. Im Verhältnis zu Kontrolle bleibt die Fluoreszenz signifikant reduziert. Die Stimulation mit LPS ( $p < 0,0001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,0002$ ), IL-6 ( $p = 0,0014$ ) sowie Serum vom septischen Patienten ( $p = 0,0006$ ) resultieren in einer signifikanten Reduktion des Fluoreszenzsignals. Die Interleukine IFN- $\gamma$  ( $p = 0,6236$ ) und IL-1 $\beta$  ( $p = 0,3245$ ) haben keinen Einfluss auf das kanalikuläre Transportprotein MRP2.

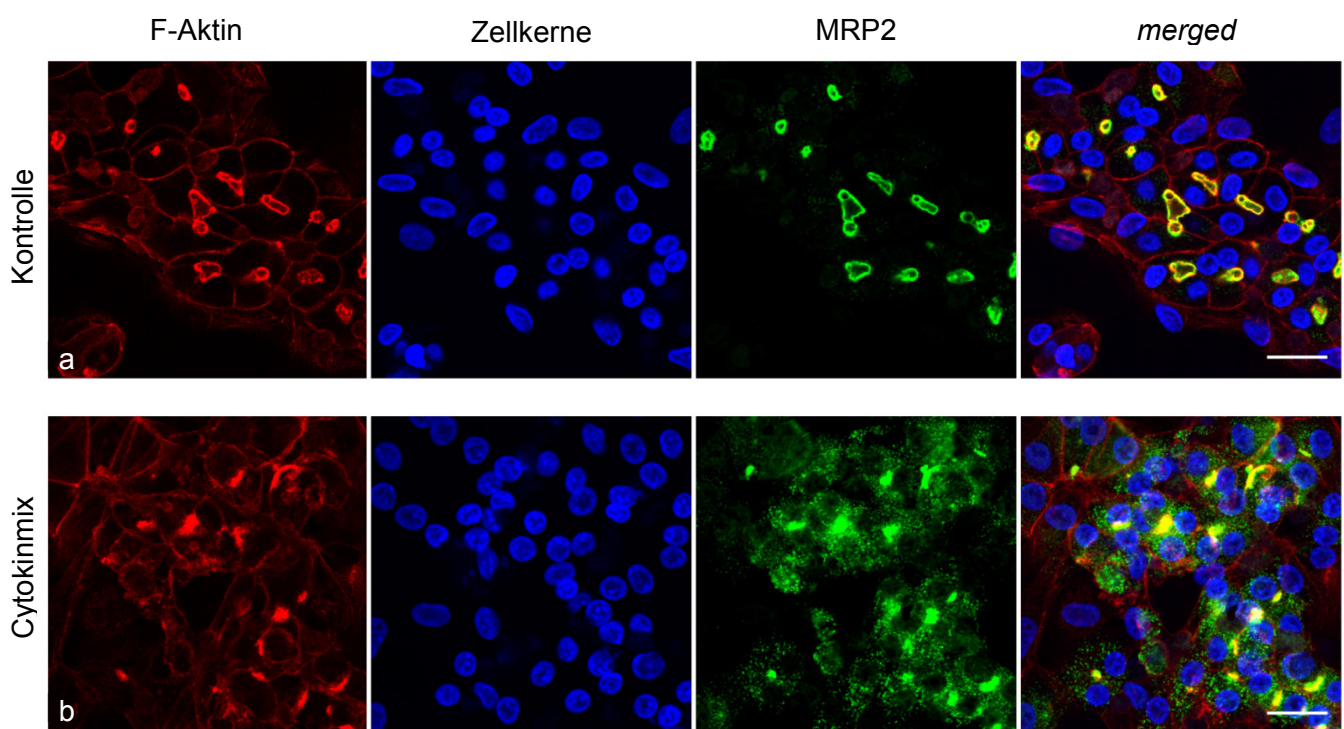
Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zu veranschaulichen, sind hier exemplarisch repräsentative Bilder der Auswertung dargestellt. **Abbildung 49** stellt die phänotypischen Verhältnisse in HepaRG Zellen nach Stimulation mit PMA und Cytokinmix dar.



**Abbildung 49: Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von MRP2 und F-Aktin in stimulierten HepaRG-Zellen (20x).** a) unstimulierte Kontrolle, b) Stimulation mit 100 nmol/l PMA über 16 Stunden, c) Stimulation mit Cytokinmix über 16 Stunden. Der rote Kanal zeigt die F-Aktin Färbung mit AF 647. Der blaue Kanal zeigt die Zellkernfärbung mit DAPI. Der grüne Kanal zeigt die MRP2-Färbung mit AF 568. Das vierte Bild zeigt eine Überlagerung aller Kanäle. Maßstabsbalken=50  $\mu$ m. Vergrößerung 20x Objektiv LSM780.

Die Zellkernfärbung zeigt, dass in jedem Ausschnitt etwa gleich viele Zellen abgelichtet wurden. MRP2 ist grün gefärbt. Die gallenkanalähnlichen Gebilde sind so gut abgrenzbar. In der F-Aktin Färbung der unstimulierten Kontrolle sind Zellgrenzen zu erkennen. Zudem sind F-Aktinreichen Binnenstrukturen, die meist kreisförmig angeordnet sind und einen Ring bilden, auszumachen. Die Überlagerung zeigt eine Kolokalisation dieser F-Aktinreichen Strukturen und der MRP2-positiven, gallengangähnlichen Strukturen.

Die Stimulation mit PMA führt phänotypisch zu einem deutlichen Rückgang der oben beschriebenen Strukturmerkmale. Runde, gallenkanalähnliche Gebilde und F-Aktinreiche Binnenstrukturen sind aber noch klar zu identifizieren. Die Cytokinmix-Stimulation führt zu einem vollständigen Zusammenbruch der Zellmorphologie. Zu erkennen ist eine kollabierte F-Aktin Binnenstruktur. Zellgrenzen sind in der F-Aktin Färbung nicht mehr klar ausmachbar. Die MRP2-Färbung zeigt teilweise noch vorhandene gallenkanalähnliche Strukturen. Diese haben keine ringförmige Struktur mehr, sondern sind verdichtet. MRP2 ist zudem in Vesikeln diffus intrazellulär zu sehen. **Abbildung 50** stellt die phänotypischen Verhältnisse in HepaRG Zellen mit einer 63fachen Vergrößerung dar.

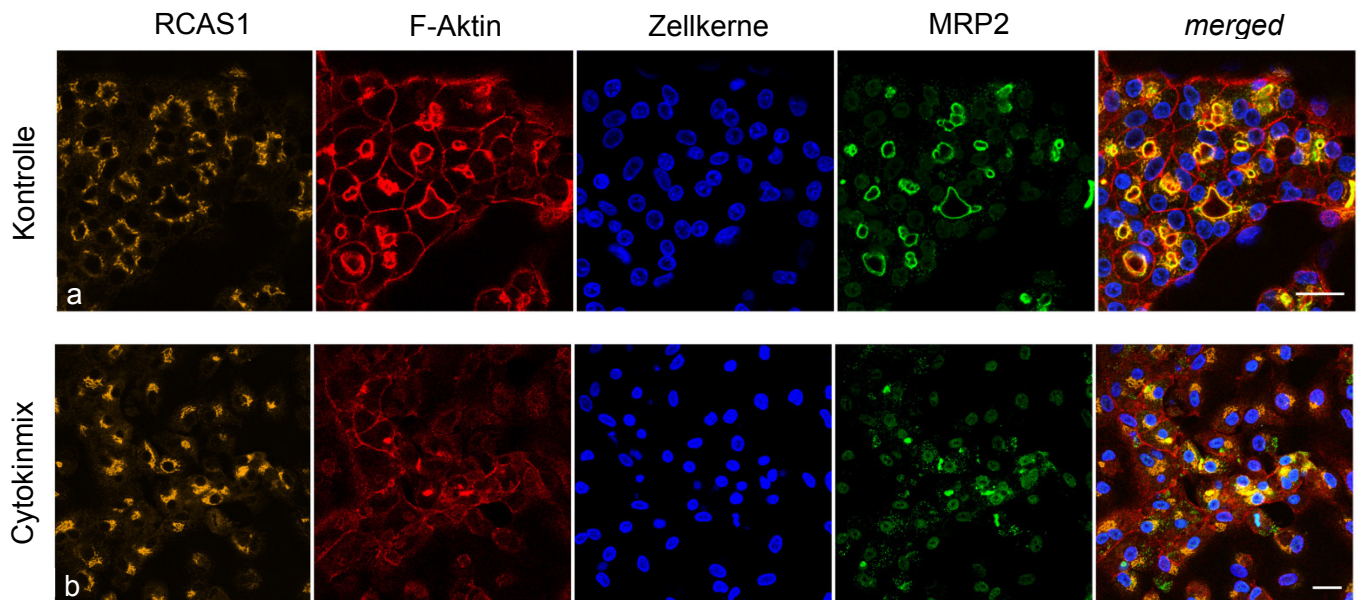


**Abbildung 50: Mikrokopie der Immunfluoreszenzfärbung von MRP2 und F-Aktin in stimulierten HepaRG-Zellen (63x).** a) unstimulierte Kontrolle, b) Stimulation mit Cytokinmix über 16 Stunden. Der rote Kanal zeigt die F-Aktin Färbung mit AF 647. Der blaue Kanal zeigt die Zellkernfärbung mit DAPI. Der grüne Kanal zeigt die MRP2-Färbung mit AF 568. Das vierte Bild zeigt eine Überlagerung aller Kanäle. Maßstabsbalken=25 µm. Vergrößerung 63x Objektiv LSM780.

Unter 63x Vergrößerung sind die bereits beschriebenen Strukturen und Vorgänge noch sehr viel präziser zu beobachten. Augenmerk muss auf die gallenkanalähnlichen Strukturen in der unstimulierten Kontrolle gelegt werden. Die Kolokalisation mit den F-Aktinreichen Binnenstrukturen wird eindeutig. Im Vergleich dazu steht die diffuse Zerstreung von MRP2 in den Cytokinmix behandelten HepaRG-Zellen.



Um die diffus intrazellulären MRP2-positiven Vesikel, die bei einer Stimulation mit Cytokinmix entstehen, genauer charakterisieren zu können, wurde in HepaRG-Zellen MRP2 und RCAS1 kofärbt. **Abbildung 51** stellt eine Kofärbung von MRP2 und Golgi-Proteinen nach Stimulation mit dem Cytokinmix dar.



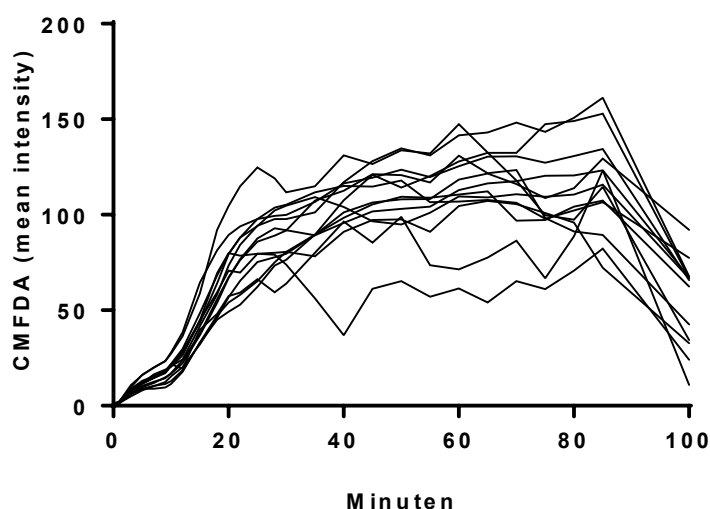
**Abbildung 51: Kofärbung von MRP2, RCAS1 und F-Aktin in HepaRG-Zellen (63x).** a) unstimulierte Kontrolle, b) 16 Stunden Stimulation mit Cytokinmix. Der gelbe Kanal zeigt die RCAS1 Färbung mit AF 488. Der rote Kanal zeigt die F-Aktin Färbung mit AF 647. Der blaue Kanal zeigt die Zellkernfärbung mit DAPI. Der grüne Kanal zeigt die MRP2-Färbung mit AF 568. Das fünfte Bild zeigt eine Überlagerung aller Kanäle. Maßstabsbalken=25 µm. Vergrößerung 63x Objektiv LSM780.

Im ersten Kanal sind Golgi Proteine mit RCAS1 angefärbt (gelb). In der unstimulierten Kontrolle sind diese RCAS1 positiven Strukturen neben den gallengangsähnlichen Gebilden zu finden. 16 stündige Cytokinmix-Stimulation führt zum bereits beschriebenen, auch hier deutlich sichtbarem Kollaps der Zellmorphologie. Die RCAS1 positiven Strukturen sind nach der Stimulation perinukleär angeordnet. In der Überlagerung der Kanäle ist erkennbar, dass die intrazellulären MRP2-Vesikel teilweise mit der RCAS1 Färbung kolokalisieren.

Um vesikuläre Strukturen bezüglich ihrer Polarisierung bewerten zu können, wurde eine Kofärbung von MRP2 und RCAS1 (*receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*) angefertigt. RCAS1 wird als tumor-assoziiertes Antigen diskutiert, welches Tumore vor Immunzellen schützt, in dem es einen Zellzyklus-Arrest herbeiführt und Apoptose induziert. Es ist ein Golgi-lokalisiertes Protein mit zytoplasmatischer Orientierung [87]. RCAS1 wird beim Menschen vom EBAG9 Gen kodiert. Der primäre Antikörper gegen RCAS1 färbt den Golgi-Apparat und Transport-Vesikel des Golgi-Apparates [88].

#### 4.8 Effekte der Stimulation auf die Exkretionsleistung des MRP2-Transporters

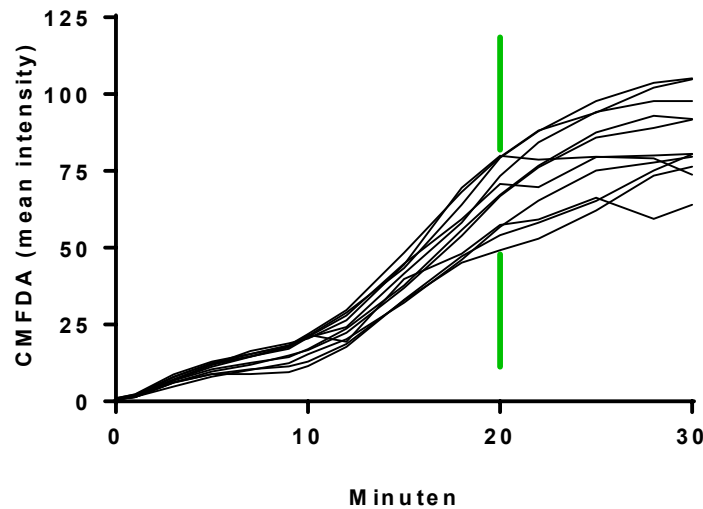
Zur Etablierung des geplanten Versuchs erforderte es einige vorhergehende Untersuchungen bezüglich der CMFDA Exkretion in HepaRG-Zellen. Dazu wurde auf unstimulierte HepaRG-Zellen 1  $\mu\text{mol/l}$  CMFDA [80] gegeben und alle 3 Minuten die Fluoreszenzintensität dokumentiert. Ausgewertet wurde die Intensität, mit der sich CMFDA in den gallengangähnlichen Strukturen ansammelte. Zur Untersuchung der Kinetik und Festlegung des Messzeitpunktes wurden 12 gallengangähnliche Strukturen über einen Zeitraum von 100 Minuten gemessen.



**Abbildung 52: Kinetik der Exkretionsleistung von MRP2-Transportern in HepaRG Zellen über 100 Minuten.** Dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 12 gallengangähnlichen Strukturen zu verschiedenen Messzeitpunkten.

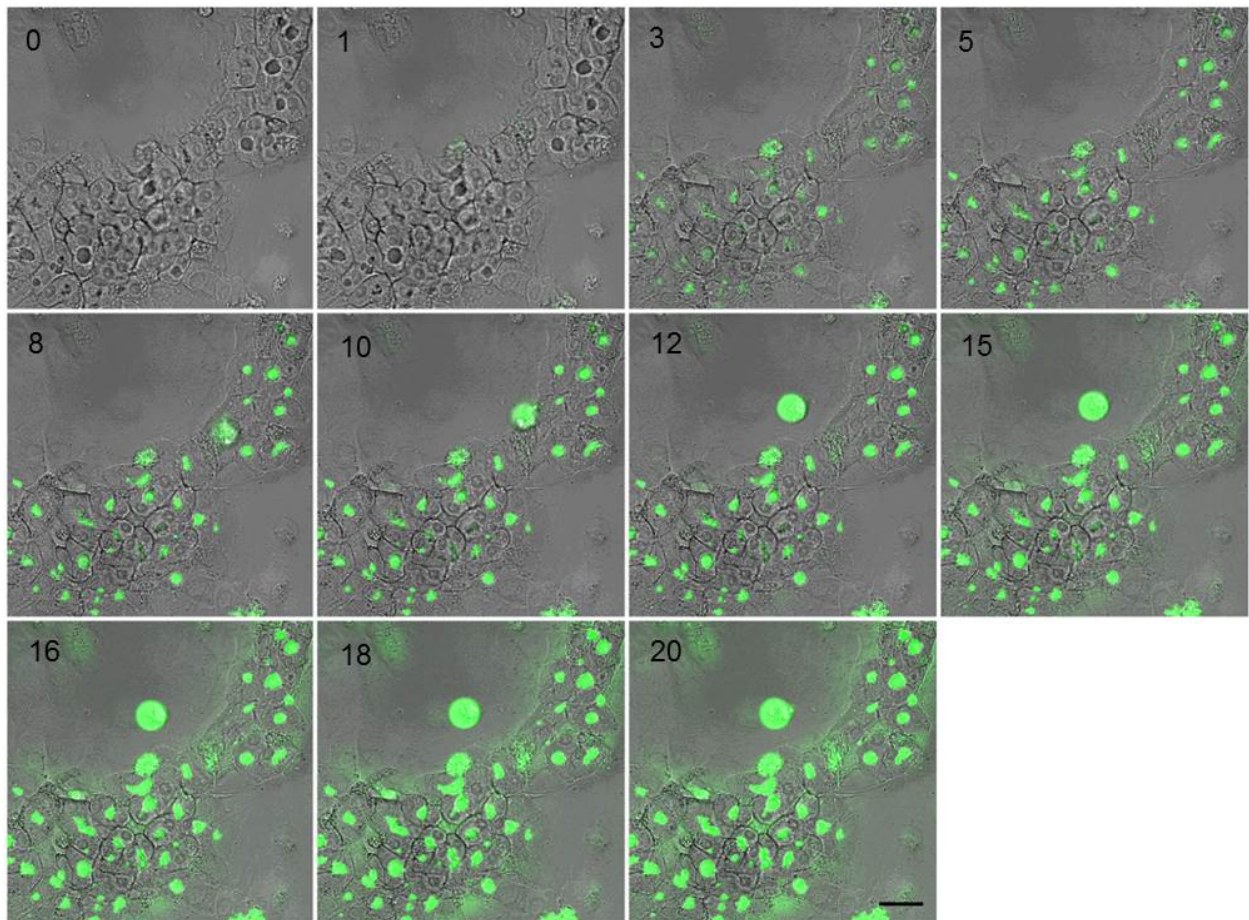
**Abbildung 52** lässt eine homogene Anreicherung der Strukturen mit CMFDA bis zum Zeitpunkt von 20 Minuten erkennen. Von der 20. bis zur 85. Minute nimmt die Streubreite, mit der CMFDA exkretiert wird, stark zu. Das Fluoreszenzsignal beginnt ab der 85. Minute sich abzuschwächen. Aufgrund der Beobachtung, dass die Fluoreszenzstreubreite ab der 20. Minute stark zunahm, wurde erneut ein Vorversuch unternommen, um die Kinetik innerhalb der ersten 30 Minuten genauer zu untersuchen. In **Abbildung 53** ist zu sehen, dass die gallengangähnlichen Strukturen nach circa zehn Minuten messbar CMFDA exkretieren. Die Exkretionskinetik verzeichnet von der 10. bis zur 20. Minute eine konstante Steigung. Dann steigt die Diversität in der Funktionstüchtigkeit der Strukturen an und die Streubreite nimmt zu. Ab der 20. Minute beginnen bereits drei Strukturen stark von der durchschnittlichen Steigung abzuweichen. Auf diesem Hintergrund wurde ein Messzeitpunkt nach 20 Minuten ausgewählt.





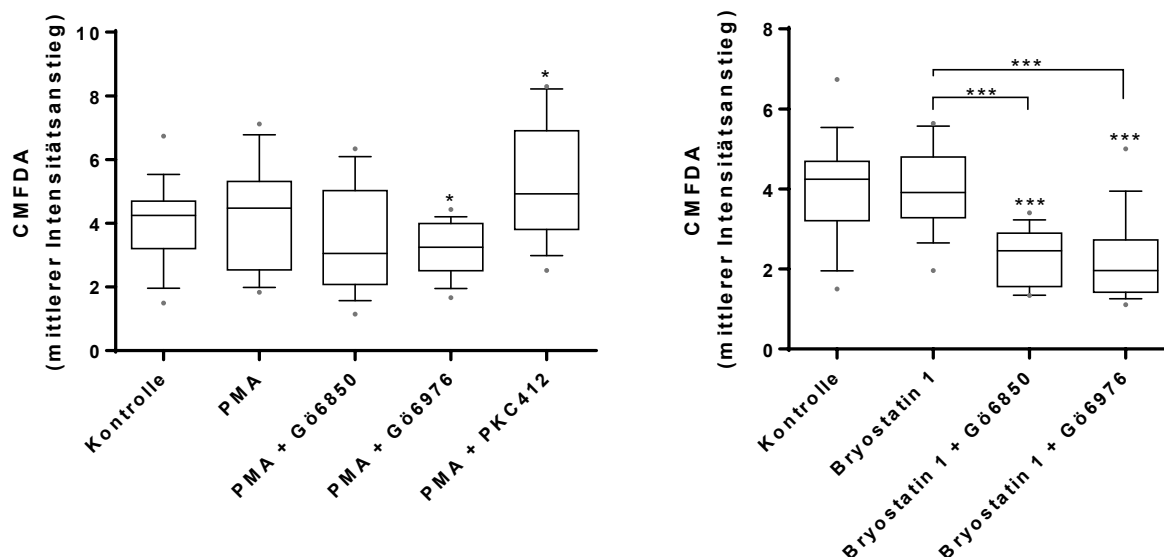
**Abbildung 53: Kinetik der Exkretionsleistung von MRP2-Transportern in HepaRG Zellen über 30 Minuten.** Dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 11 gallengangsähnlichen Strukturen zu verschiedenen Messzeitpunkten. Grüner Strich : festgelegter Messzeitpunkt für die Stimulationsversuche.

**Abbildung 54** veranschaulicht die Exkretion von CMFDA über einen Zeitraum von 20 Minuten.



**Abbildung 54: Lebendzellmikroskopie. Exkretionsleistung MRP2-Transportern in HepaRG-Zellen über 20 Minuten.** Anreicherung der gallengangsähnlichen Strukturen mit grün fluoreszierendem CMFDA. Ziffern=Minuten; Maßstabsbalken=30 μm. Vergrößerung 20x Objektiv LSM780.

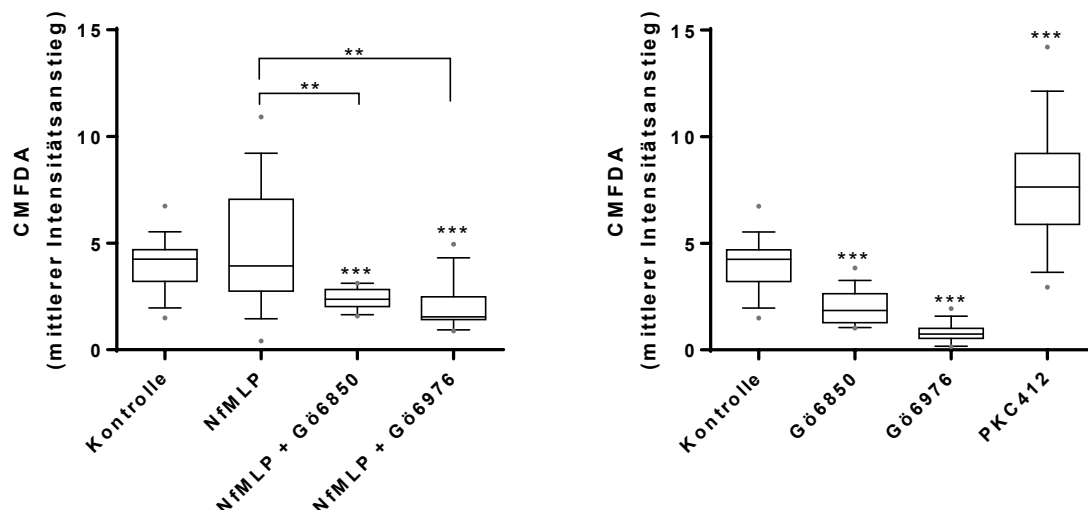
Die Fluoreszenz in einem gemessenen Areal entspricht dem funktionellen Exkretionsvermögen der gallengangähnlichen Struktur in diesem Bereich. Die Boxplots stellen den mittleren Intensitätsanstieg über 20 Minuten dar. **Abbildung 55** stellt die Exkretionsleistung der HepaRG-Zellen nach Stimulation mit PMA und Bryostatin 1 dar.



**Abbildung 55 : Exkretionsleistung von MRP2-Transportern HepaRG-Zellen nach 16 stündiger Stimulation mit PMA und Bryostatin 1.** Gezeigt ist der mittlere Intensitätsanstieg der Fluoreszenz von CFMDA über 20 Minuten. Konzentrationen= PMA 100 nmol/l, Bryostatin 1 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, n=4. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker Intervall 10. bis 90. Perzentile. Ausreißer sind als Punkte gekennzeichnet. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

Die Exkretion von CFMDA in HepaRG-Zellen wird durch Stimulation mit PMA nicht beeinflusst. Die Kostimulation mit PKC-Inhibitoren führt zu einem Absinken des Exkretionsvermögens. Bei Gö6976 signifikant ( $p = 0,0369$ ). Die Behandlung mit PMA und PKC412 ( $p = 0,0421$ ) führt zu signifikant stärkerer Exkretion von CFMDA. Die Stimulation mit Bryostatin 1 hat ebenso keinen Einfluss auf die Exkretionsleistung. Eine funktionelle Einschränkung, signifikant gegenüber der Kontroll- und der Bryostatin 1 Gruppe, bringt die Kostimulation mit Gö6850 ( $p < 0,0001$ ) und Gö6976 ( $p < 0,0001$ ) mit sich.

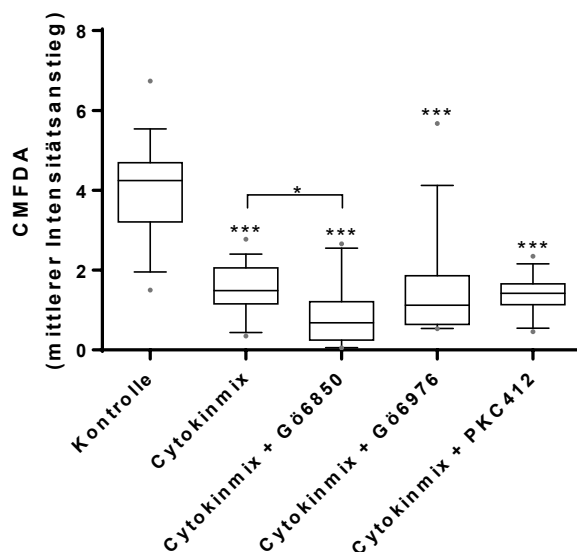
**Abbildung 56** stellt die Exkretionsleistung der HepaRG-Zellen nach Stimulation mit *NfMLP* und PKC-Inhibitoren dar.



**Abbildung 56 : Exkretionsleistung von MRP2-Transportern HepaRG-Zellen nach 16 stündiger Stimulation mit *NfMLP* und PKC-Inhibitoren.** Gezeigt ist der mittlere Intensitätsanstieg der Fluoreszenz von CFDA über 20 Minuten. Konzentrationen= *NfMLP* 100 nmol/l, Gö6850 200 nmol/l, Gö6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, n=4. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker Intervall 10. bis 90. Perzentile. Ausreißer sind als Punkte gekennzeichnet. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

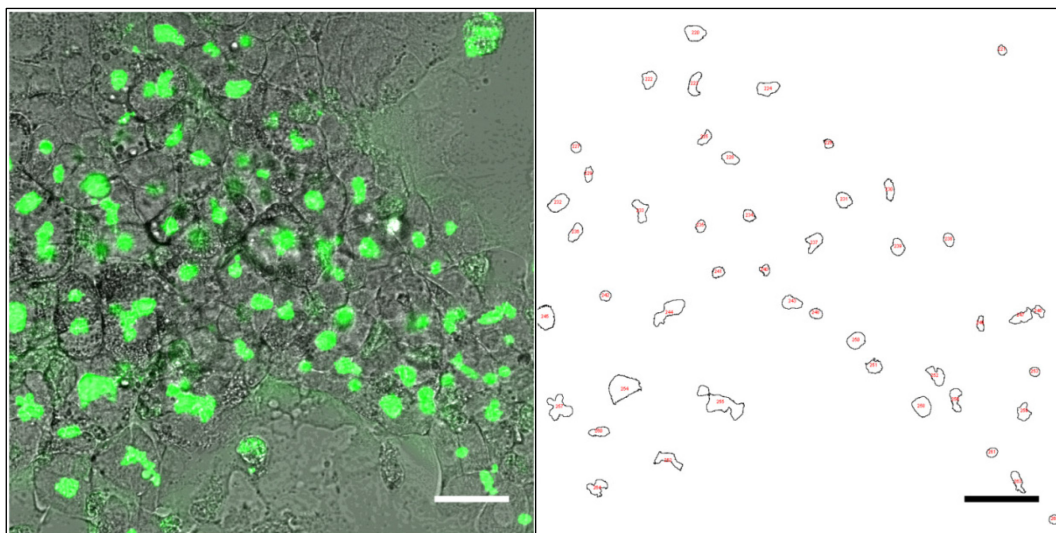
Die Stimulation mit *NfMLP* führt zu einer höheren Streubreite der Werte, aber zu keinem signifikanten Unterschied. Die Kostimulation mit Gö6850 und Gö6976 reduziert den Intensitätsanstieg signifikant, ebenso mindern die PKC-Inhibitoren alleine die Exkretionsleistung hochsignifikant (p Werte  $< 0,0001$ ). Die alleinige Stimulation mit PKC412 führt zu einer signifikanten Leistungssteigerung der CFDA Exkretion

**Abbildung 57** stellt die Exkretionsleistung der HepaRG-Zellen nach Stimulation mit dem Cytokinmix dar.



**Abbildung 57 : Exkretionsleistung von MRP2-Transportern HepaRG-Zellen nach 16 stündiger Stimulation mit Cytokinmix.** Gezeigt ist der mittlere Intensitätsanstieg der Fluoreszenz von CMFDA über 20 Minuten. Konzentrationen= G6850 200 nmol/l, G6976 200 nmol/l, PKC412 200 nmol/l, Cytokinmix (enthält: 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ). n=4. Boxplots zeigen Median und Interquartilsabstand. Whisker Intervall 10. bis 90. Perzentile. Ausreißer sind als Punkte gekennzeichnet. (\* : p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* : p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* : p-Wert  $\leq 0,001$ )

Die Stimulation der HepaRG-Zellen mit dem Cytokinmix führt in allen Gruppen zu einem hochsignifikanten Rückgang der Exkretion von CMFDA.



**Abbildung 58: Darstellung einer exemplarischen Auswertung der Lebendzellmikroskopie mit ImageJ.** Zu sehen sind HepaRG-Zellen 20 Minuten nach Zugabe von 1  $\mu\text{mol/l}$  CMFDA. Der Grenzwert für die Fluoreszenzintensität wurde von 20 bis 255 gesetzt. Fluoreszenzintensitäten < 20 wurden als Hintergrund gewertet. Die nummerierten Umrandungen im rechten Bild zeigen die analysierten Bereiche, an denen eine CMFDA Exkretion gemessen wurde. Maßstabsbalken=30  $\mu\text{m}$ . Vergrößerung 20x Objektiv LSM780.

## 5 Diskussion

Die Cholestase ist eine häufige klinische Komplikation, die mit einer ungünstigen Prognose für den Verlauf einer Sepsis assoziiert ist. Die inflammatorische Leberschädigung als Teil des septischen Multiorganversagens kann als Resultat der Sepsis-assoziierten Cholestase betrachtet werden [89]. Die von Kupffer-Zellen ausgeschütteten proinflammatorischen Cytokine führen zu einer fehlregulierten hepatobiliären Homöostase, die den sinusoidalen und kanalikulären Galletransport beeinträchtigt [19]. Die hepatische Dysfunktion wird aktuell an einem Anstieg u.a. des Serumbilirubins gemessen und als Teil des septischen Multiorganversagens betrachtet [34]. Der hepatozelluläre Defekt führt insgesamt zu einer Störung der Biotransformation und einem dysregulierten Transport von Endo- und Xenobiotika innerhalb von Stunden nach Infektion. Recknagel *et al.* konnten einen Serum-Anstieg von Gallensäurespezies (CDCA und TDCA) im Serum schon 24 Stunden nach dem Beginn einer Sepsis zeigen [30]. Die cholestatischen Effekte von bakteriellen Endotoxinen und proinflammatorischen Cytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) sind maßgeblich an der Entwicklung der septischen Cholestase beteiligt [20]. Damit einher gehen die Ergebnisse von Bolder *et al.*, die nach nur wenigen Minuten eine Reduktion der kanalikulären Gallesekretion als Reaktion auf eine experimentelle Endotoxinämie zeigen [90].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell der septischen Cholestase etabliert und charakterisiert sowie der Einfluss der Cytokine auf die Zellintegrität und exkretorische Funktion von Hepatozyten untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Signaltransduktion von Proteinkinase-C-Isoformen und PI3K/Akt, deren Aktivität die molekularen Mechanismen, die zur septischen Cholestase führen maßgebend beeinflusst [91].

Die experimentelle Studie analysiert und strukturiert die Aktivierung der PKC Signaltransduktion durch Cytokine sowie den Einfluss von PKC-Aktivatoren und Inhibitoren auf die paraklinischen Leberparameter und die hepatozelluläre Funktion. Dabei wird neben der Transkription auch die Proteinebene der beteiligten Effektoren dargestellt und durch eine funktionelle Analyse mittels Immunfluoreszenz und *Life-Cell-Imaging* komplementierend ergänzt.

### 5.1 Die HepRG-Leberzelllinie

Die Experimente zur Untersuchung der Cholestase als frühe maladaptive Wirtsantwort wurden in der vorliegenden Studie an einer Leberzelllinie (HepaRG) im Sepsis-Modell durchgeführt.

Die HepaRG-Zelllinie wurde Ende der 90er Jahre von einer französischen Forschungskollaboration der Universitäten Lyon und Rennes entwickelt. Die Zelllinie stammt aus einem humanen hepatocellulären Karzinom. Benannt ist sie nach ihren Entdeckern **R** - Sylvie Rumin und **G** - Philippe Gripon. Im Jahr 2002 wurde sie erstmals von Gripon *et al.* beschrieben [69]. Die Zellen dieser Zellreihe differenzieren nach einem initiierten Wachstumsstopp mit DMSO zu epithelialen sowie Hepatozyten-ähnlichen Zelltypen und bilden gewebesähnliche Strukturen aus. Studien haben gezeigt, dass die HepaRG-Zelllinie ein erfolgsversprechendes Modell zur Untersuchung von cholestatischen Effekten und Medikamenten-induziertem Leberversagen ist [92-94]. Die Zellen weisen ähnliche Charakteristika wie primäre humane Hepatozyten (PHH) auf und exprimieren die Leberenzyme (inklusive der Phase I, II und III Enzyme), die im klinischen Alltag zur Abschätzung der hepatischen Zellintegrität und -funktionalität herangezogen werden. So kann das Ausmaß der Leber-spezifischen Wirtsreaktion *in vitro* detektiert werden [95-97]. Die in der Arbeit verwendeten HepaRG-Zellen exprimierten die Leberenzyme ALAT, ASAT, LDH,  $\gamma$ -GT und Laktat in zur Analyse nachweisbarem Maße und entwickelten ausdifferenziert MRP2-positive, gallenkanalähnliche Strukturen. Im vitalen Zustand konnte die Exkretion von CMFDA über den kanalikulären Transporter MRP2 und die Akkumulation innerhalb der gallenkanalähnlichen Lumina gezeigt werden.

Die verwendete Zelllinie bot somit adäquate Bedingungen, die inflammatorische Cholestase unter experimentellen Bedingungen im Hinblick auf zugrundeliegende Pathomechanismen zu charakterisieren.

### 5.1.1 HepaRG-Sphäroide

Die konventionelle Monolayer Zellkultur stellt jedoch kein ideales Abbild der komplexen dreidimensionalen, gewebetypischen Struktur von Organen *in vivo* dar. Um das Verständnis der Zellarchitektur und der Polarisierung der Hepatozyten zu spezifizieren, wurde zusätzlich eine 3D-Zellkultur als Modell etabliert. 3D Zellmodelle aus HepaRG-Zellen (HepaRG-Sphäroide) werden zunehmend verwendet, um die zellulären Vorgänge von Leberschädigungen experimentell zu untersuchen [97]. Sie sind Sphäroiden aus primären humanen Hepatozyten (PHH) überlegen, die *in vitro* schnell dedifferenzieren. Hepatische 3D Kulturen aus HepaRG-Zellen sind über einen längeren Zeitraum ohne Verlust des hepatischen Phänotyps (Polarität, funktioneller Galletransport, Enzymaktivität) kultivierbar [94]. Die Verwendung neuer Zellkulturmodelle, insbesondere der Sphäroide, birgt Risiken und Restriktionen, die Beachtung finden müssen.

Der Metabolismus und die Genexpression von 3D-Zellkulturen sind heterogener als die von Monolayern. Diese Heterogenität wird besonders durch die Größe des Sphäroids beeinflusst [98]. Die O<sub>2</sub>-Diffusionskapazität beschränkt die maximale Größe des nicht-vaskularisierten Sphäroids auf < 200 µm [99]. Für HepaRG-Sphäroide konnte gezeigt werden, dass 2000 eingesetzte Zellen erfolgreich reproduzierbare Sphäroide mit einem Durchmesser von ca. 200 µm, einer hohen Zellviabilität ohne nekrotischen Kern und einer kompakten Struktur formen [70]. Aufgrund dieser, im Verhältnis zur Monolayer-Kultur geringen Zellzahl muss eine Vielzahl von Sphäroiden eingesetzt werden, um molekulare und funktionelle Mechanismen mit den gängigen experimentellen Methoden nachzuweisen [100]. In der vorliegenden Arbeit konnten in HE-gefärbten, multizellulären HepaRG-Sphäroiden strukturelle und funktionelle Eigenschaften mit einer räumlichen Orientierung gezeigt werden, die den physiologischen Bedingungen der Leber nahekamen. Die HepaRG-Sphäroide erwiesen sich als geeignetes Modell zur Identifizierung und Charakterisierung besonders von strukturellen Eigenschaften, die in Monolayer-Kulturen nicht exprimiert wurden.

Mit der verwendeten Zelllinie war es möglich, Auswirkungen der Cholestase auf Zellintegrität sowie Funktion und Lokalisation von Zellbestandteilen zu charakterisieren und Komponenten der exkretorischen Dysfunktion im frühen septischen Geschehen zu analysieren. Aufgrund der physiologischen Eigenschaften der HepaRG-Zellen sowie der entsprechenden Ähnlichkeit mit PHH und humaner Leber waren sie das geeignete Modell, um Rückschlüsse auf die Prozesse der septischen Cholestase *in vivo* zu ziehen [96].

### 5.2 Die Zellantwort - *readout*

Die Entwicklung einer frühen septischen Cholestase wurde einerseits auf **funktioneller** und andererseits auf **molekularer** Ebene betrachtet und ausgewertet. Im SOFA-Score, der seit der neuen Sepsis-Definition 2016 auch zur Diagnostik einer Sepsis angewendet wird, soll das hepatobiliäre Versagen anhand eines Serumbilirubin-Anstiegs erfasst werden [1]. In physiologischem Zustand werden Bilirubin und sulfatierte/glucuronidierte Gallensalze über den kanalikulären Transporter ABCC2/MRP2 in den *Canaliculus biliferi* exkretiert [101]. MRP2 wird als Schlüsseltransporter in der Galleformation und unabhängigem Gallefluss angesehen [33]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit als *readout* der hepatischen Dysfunktion die Genexpression, die Lokalisation und die Funktion des kanalikulären MRP2-Transporters und seines Membranankers Radixin verwendet.

Das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung wurde anhand der **paraklinischen Laborwerte** der Organdysfunktion bestimmt. Diese erlauben Rückschlüsse auf die zelluläre Integrität, da die Höhe des Enzymanstiegs mit Ausmaß der Schädigung korreliert. Die Parameter der Organdysfunktion erfassen weder die komplexen metabolischen und immunologischen Prozesse, noch können sie Aussagen über die Polarität der heterogenen Komposition des Hepatozyten treffen [102]. Um die funktionelle Dynamik der Gallesekretion besser zu charakterisieren, wurden die klinisch-chemischen Parameter durch einen experimentell etablierten Test ergänzt. Die **Exkretionsleistung** des kanalikulären MRP2-Transporters wurde in funktionell aktiven HepaRG-Zellen anhand des CMFDA Efflux gemessen [80]. Zusätzlich ergab die Färbung spezifischer Zellkomponenten Aufschluss über die **Lokalisation** von MRP2 und die **Polarität** der HepaRG-Zellen. Die funktionell phänotypischen Aspekte der septischen Cholestase wurden durch die molekularen Genexpressionsanalysen ergänzt. Eine Regulierung der **Genexpression** von PKC-Isoformen spricht für eine Beteiligung der PKC-abhängigen Signalkette. Die gesteigerte Genexpression weist jedoch nicht zwangsläufig eine Aktivierung der PKC nach. Ein verlässlicheres *readout* für die Aktivierung der Proteinkinase-C ist der Nachweis einer induzierten **Membrantranslokation** [56]. Folglich wurde in der vorliegenden Arbeit die limitierte Analyse der Genexpressionsrate von Kinasen um die Fraktionierung (Membran/Cytosol) der HepaRG-Zellen erweitert und in den Zellkompartimenten enthaltene PKC-Isoformen charakterisiert.

### 5.3 Der Cytokinmix als Sepsis-Modell

Das angewendete Sepsis-Modell im experimentellen *Setting* beinhaltete die Stimulation der HepaRG-Zellen mit Cytokinen und Endotoxinen. Der Cytokinmix enthielt LPS als *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) und die physiologischer Weise von Kupffer Zellen ausgeschütteten proinflammatorischen Cytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  [103]. Die Inkubation von Zellen mit einem Cytokinmix ist ein häufig genutztes, leicht durchzuführendes und gut reproduzierbares Sepsis-Modell. Es gewährleistet große *in vitro* Homogenität und hat, bis auf die mögliche Verwendung zu hoher Konzentrationen, kaum Restriktionen. Die Aktivierung der Proteinkinase-C und die Internalisierung von MRP2 sind Prozesse, die innerhalb von Minuten bis Stunden nach einem inflammatorischen Geschehen auftreten [104]. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Stimulationsendpunkte von 6 und 16 Stunden gewählt; Zeitpunkte, die innerhalb der frühen, septischen Cholestase liegen und das genaue Charakterisieren der involvierten Signaltransduktion ermöglichen.



### 5.3.1 Der applizierte Cytokinmix führt zu einem Verlust der hepatozytären Integrität

Die Inkubation der HepaRG-Zellen mit dem Cytokinmix resultierte unter anderem in einem akuten Zellschaden. Neben der signifikanten Elevation der analysierten Integritätsparameter (ALAT, ASAT, LDH und Laktat) verdeutlichte auch der mikroskopische Phänotyp das inflammatorische Geschehen. Die Inkubation der Leberzellen mit Serum vom septischen Patienten führte zu einem ähnlich pathologischen Profil der Funktionsparameter. Diese Ergebnisse belegen die Wirksamkeit des Cytokinmixes als Auslöser einer hepatozytären Schädigung. IL-1 $\beta$  kann in diesem Zusammenhang eine maßgebliche Bedeutung zugesprochen werden, da es als einziges Interleukin Bestandteil beider Stimuli war. In der vorliegenden Arbeit konnten neben diesem auch TNF- $\alpha$  und IL-6 als Bestandteile des Cytokinmixes identifiziert werden, die zu einem Anstieg der Transaminase ASAT führte (**Abbildung 39**). Dieses Ergebnis unterstützt die These von Geier *et al.*, dass das proinflammatorische Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  an der verringerten Expression von kanalikulären Galletransportern im Zuge einer Endotoxin-induzierten Cholestase maßgeblich beteiligt sind [35]. Die Elevation der Laktatwerte durch IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie LPS spricht für ein Mitwirken der Interleukine an der Entwicklung einer septischen Cholestase und für die Eignung des Modells. Der Ischämie-Marker Laktat ist von hoher prognostischer Bedeutung und im Verlauf des septischen Leberversagen häufig erhöht. In der frühen Phase einer Sepsis ist der Laktatanstieg zusätzlich mit erhöhter Mortalität verbunden [105].

Der Cytokinmix löste eine Inflamationsreaktion aus, die zu einer signifikanten Elevation der Zellintegritätsparameter führte; er erfüllte die Voraussetzungen für ein praktikables, reproduzierbares Sepsis-Modell.

### 5.3.2 Proinflammatorische Stimuli induzieren in HepaRG-Zellen eine Cholestase

Für den kanalikulären Transporter MRP2 konnte im septischen Geschehen eine herabregulierte Expression nachgewiesen werden, die für die eingeschränkte Exkretionskapazität im septischen Geschehen mitverantwortlich gemacht wurde [34]. In der vorliegenden Arbeit konnte auf genregulatorischer Ebene 16 Stunden nach Sepsis-Induktion ebenso eine signifikante Herabregulierung von MRP2 gezeigt werden (**Abbildung 28**). Alle Einzelbestandteile des Cytokinmixes verminderten die Genexpression von MRP2, TNF- $\alpha$  jedoch als einziges Cytokin signifikant.

Dies bestätigt größtenteils die Ergebnisse von Diao *et al.*, der 2010 in *Sandwich*-Kulturen primärer humaner Hepatozyten zeigte, dass TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 die mRNA- und Proteinexpression von MRP2 innerhalb von 24-48 Stunden reduzierten [106]. Für das Interleukin-6 konnte in dieser Arbeit kein Einfluss auf die Genexpression von MRP2 in HepaRG-Zellen nachgewiesen werden. Die bereits beschriebene Herabregulierung von MRP2 im Zuge einer klinisch manifesten Sepsis konnte unter den hier verwendeten experimentellen Sepsis-Bedingungen in der Zellkultur nachvollzogen werden. Damit bat das Modell optimale Voraussetzungen zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen und zu Rückschlüssen auf die humane Signaltransduktion *in vivo*. Die mit der Herabregulierung der MRP2-Expression verbundene Cholestase konnte phänotypisch gezeigt werden (**Abbildung 50**). Der Cytokinmix-induzierte Kollaps der physiologisch gebildeten, gallenkanalähnlichen Strukturen führte zu einem drastischen Funktionsverlust des kanalikulären Transports in HepaRG-Zellen (**Abbildung 57**). Der MRP2-Transporter konnte nicht mehr exklusiv an Membranen der gallenkanalähnlichen Lumina nachgewiesen werden, sondern akkumulierte in cytosolischen Vesikeln. Auch an dieser Translokation von MRP2 wurde eine signifikante Partizipation der Cytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und LPS deutlich (**Abbildung 48**). Dies weist auf das Mitwirken dieser, im Cytokinmix enthaltenen Interleukine an der hepatischen Dysfunktion im verwendeten Zellmodell hin. Die diskutierten Ergebnisse legen nahe, dass TNF- $\alpha$ , da sowohl auf Genexpressions-, als auch auf funktioneller Ebene eine signifikante Herabregulierung von MRP2 induzierend, einer der Hauptakteure in der Pathologie der frühen septischen Cholestase ist. Um den umstrittenen Einfluss der einzelnen Cytokine auf die Signalkaskade der exkretorischen Dysfunktion in der Sepsis eingehender zu charakterisieren und potentielle therapeutische Angriffspunkte zu detektieren, bedarf es hier weiterer Forschungsbemühungen.

Mit dem Cytokinmix konnte in den HepaRG-Zellen eine exkretorische Dysfunktion auf funktioneller und molekularer Ebene induziert werden, die in einem Leberzellschaden resultierte und den klinischen Charakteristika einer septischen Cholestase glich. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung des Cytokinmixes die Anforderungen an ein Sepsis-Modell erfüllt, dass in weiten Teilen den septischen Geschehnissen des Leberversagen *in vivo* entspricht. So bietet er valide Bedingungen zur Identifizierung der beteiligten zellulären Mechanismen.

### 5.4 Polaritätsverlust der Hepatozyten in der frühen inflammatorischen Phase

Kojima *et al.* beobachteten 2003 das Phänomen der submembranäre Transporterakkumulation am kanalikulären Pol der Hepatozyten. Als Ursache einer Cholestase wurde neben der Herabregulierung der Galletransporter auch ein Insertionsdefekt des MRP2-Transporters an der kanalikulären Membran beschrieben. Sie stellten die Vermutung auf, dass nicht nur ein endocytotischer Rückzug, sondern auch ein fehlgerichteter Transport Ursache der pathologischen Umverteilung sein könnte [64].

In der vorliegenden Arbeit konnte mit der Färbung von Golgi-Proteinen gezeigt werden, dass die cytosolisch akkumulierenden MRP2-Vesikel nicht nur retraktiver Art (von der kollabierten kanalikulären Membran), sondern teilweise auch neu modifizierte Golgi-Vesikel waren (**Abbildung 51**). Die Sepsis-Induktion führte zu einem Polaritätsverlust der Hepatozyten, der einen Defekt der zellinternen Transportmechanismen (vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran) zur Folge hatte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Cholestase in der frühen Phase einer Inflammation nicht nur ein Rückzug von der Membran (der auf eine regulatorische Komponente hinweist), sondern auch ein Insertionsdefekt von MRP2 (der für einen Polaritätsverlust der HepaRG-Zellen spricht) zu Grunde liegt. Die Sepsis führt scheinbar schon früh zu einem Polaritätsverlust der Hepatozyten, die im depolarisierten Zustand den zielgerichteten Transport von Zellkomponenten und die Balance zwischen aufzunehmenden und zu sekretierenden Gallensäuren nicht mehr aufrechterhalten können. Die in dieser Arbeit erworbenen Resultate sind ein Ansatz, die Bedeutung der intrazellulären Polarität in den Hepatozyten besser zu verstehen.

Weitere Studien zur Depolarisation als Ursache der fehlerhaften Translokation und Insertion von Galletransportern im frühen septischen Geschehen sind notwendig, um zu Grunde liegende Pathomechanismen aufzudecken und mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu generieren.

### 5.5 Die Exkretorische Dysfunktion in der frühen Sepsis ist PKC-vermittelt

Der Proteinkinase-C-Familie wird neben anderen Signalregulatoren zunehmend eine wichtigere Rolle in der Regulation der physiologischen Galleproduktion sowie der pathologischen Cholestase zugesprochen. Nur die Aktivierung intrazellulärer Signalwege ermöglicht kurzfristig eine dynamische posttranslationale Modifikation der beteiligten Transporter und Strukturproteine [56].

#### 5.5.1 Homologe PKC Expressionslevel in den verwendeten Zellreihen

Um einen Überblick über die Expression der PKC-Isoformen in den verwendeten Zellreihen (HepaRG und HepG2) zu erhalten, wurde ein Genexpressionsprofil erstellt (**Abbildung 15**). Mayati *et al.* konnten 2015 zeigen, dass die Expression der PKC-Isoformen in HepaRG-Zellen und primären humanen Hepatozyten eng korrelieren. Die Relevanz der Zelllinie wird durch die hohe Übereinstimmung der Expressionsprofile deutlich. Sie bieten eine überzeugende, ethisch uneingeschränkte Alternative zu PHH [57]. Die erstellten Profile entsprechen im Wesentlichen den Ergebnissen von Mayati *et al.*, so dass auch in dieser Versuchsreihe von einer hohen Korrelation zu PHH ausgegangen werden konnte.

In Bezug auf Studien zur PKC Signaltransduktion ist die HepaRG-Zelllinie ein etabliertes Modell, welches aufgrund dieser hohen Korrelation Rückschlüsse auf die Vorgänge *in vivo* erlaubt.

#### 5.5.2 Der Sepsis-Induktion folgt eine PKC-Aktivierung

An den unterschiedlichen *readouts* der Zellantwort konnte auf molekularer Ebene sowie funktionell eine deutliche Aktivierung der PKC durch die proinflammatorischen Stimuli nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene zeigten sich zeitabhängige und isoformspezifische Effekte. Die Genexpressionsanalyse der PKC-Isoformen ließ zwei zeitlich versetzte Regulierungsprofile als Reaktion auf die Sepsis-Induktion erkennen. In der frühen Phase (6 Stunden) der Inflammation schienen die atypischen PKC  $\zeta$  und  $\iota$  an den Regulationsmechanismen erheblich beteiligt. Nach 16 Stunden reagierten die klassischen und die neuen Isoformen ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\theta$  und D1) mit einer signifikanten Hochregulierung. Die neue PKC  $\theta$  scheint zu beiden Zeitpunkten in die regulatorischen Prozesse involviert (**Abbildung 19**). Die hepatische Dysfunktion scheint in der frühen Phase der Sepsis durch eine erhöhte Ableserate der atypischen PKC, und im Verlauf durch eine gesteigerte Expression der klassischen und neuen Isoformen vermittelt zu sein.

Vor dem Hintergrund der beobachteten Genregulation ist die Vermutung naheliegend, dass die PKC-aktivierten Signalwege an der Entwicklung einer exkretorischen Dysfunktion in der Sepsis Verantwortung tragen. Die Ergebnisinterpretation einer PKC Genexpressionsrate ist jedoch limitiert. Die Regulierung der Genexpression von PKC-Isoformen spricht zwar für eine Beteiligung der PKC-abhängigen Signalkaskade, eine Aktivierung der Proteinkinase-C ist jedoch durch eine erhöhte Genexpression nicht nachgewiesen.

Aufgrund der Annahme, dass klassische und atypische PKC in die frühen septischen Vorgängen involviert sind, wurde die aktivierende Translokation der PKC  $\alpha$  und  $\zeta$  an die Membran auf Proteinebene untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein proinflammatorisches Geschehen in HepaRG-Zellen initial zu einer aktivierenden Membrantranslokation der PKC  $\zeta$  führte, so dass dieser atypischen PKC eine entscheidende Funktion in der pathologischen Signaltransduktion zugesprochen werden kann (**Abbildung 33**). Der Nachweis einer erhöhten Genexpression gemeinsam mit der gesteigerten Aktivität an der Membran deuten auf eine Beteiligung der PKC  $\zeta$  an der hepatischen Dysfunktion im initialen septischen Geschehen hin.

Dieses Fazit unterstützt die 2009 von Stross *et al.* entwickelte These einer spezifischen Funktion der PKC  $\zeta$  in Bezug auf die Gallesekretion, basierend auf einer nachgewiesenen Kolokalisation dieser Isoform und MRP2 an der kanalikulären Membran humaner Hepatozyten [107].

Die PKC  $\alpha$  zeigt eine kontinuierlichere Aktivitätssteigerung auf die Cytokinmix-Stimulation als die PKC  $\zeta$  und für beide Zeitpunkte (6 und 16 Stunden) eine signifikante Translokation an die Plasmamembran (**Abbildung 32**). Aufgrund der beobachteten Zunahme der Genexpression und Aktivierung der PKC  $\alpha$  ist eine relevante Beteiligung der von ihr abhängigen Signalkaskade an den pathophysiologischen Vorgängen im frühen Verlauf der septischen Cholestase wahrscheinlich. Weitere Studien zur Membrantranslokation der PKC-Isoformen in der frühen Sepsis wären hier sicherlich interessant und angebracht. Besonders Vertreter der neuen PKC Gruppe ( $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\theta$ ), welche hier nicht detaillierter untersucht wurden, sollten in weitere experimentelle Aktivierungsprofile einbezogen werden.

### 5.5.3 Der Einfluss der Cytokine auf die PKC mRNA Expression

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen zu der Annahme, dass die Wirkung des Cytokinmixes auf Leberparameter und exkretorische Dysfunktion der untersuchten Zellreihe eine exponentielle Verstärkung aller Einzelcytokine ist. Auf die einzelnen Cytokine (LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) reagierte die PKC mRNA-Expression jedoch mit einem heterogenen Regulationsmuster, das die Resultate aus der Cytokinmix-Stimulation nicht widerspiegelte. Besonders TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 konnte, in Bezug auf Zellintegrität und exkretorische Funktion der HepaRG-Zellen, ein negativer Effekt nachgewiesen werden, der eine Beteiligung dieser Cytokine auch an den PKC-vermittelten Vorgängen der frühen septischen Cholestase nahelegt.

Interessanterweise zeigte die Stimulation mit den Cytokinen einen herabregulierenden Effekt auf die Expressionsrate der Proteinkinase-C. TNF- $\alpha$  führte im verwendeten Zellmodell zu einer Cholestase (**Abbildung 48**), bei allen untersuchten Transkripten jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die gezeigten cytotoxischen Effekte von TNF- $\alpha$  in HepaRG-Zellen auf Genexpressionsebene durch eine potente Herabregulierung der PKC vermittelt wird. Dass cytotoxische Effekte von TNF- $\alpha$  generell PKC-vermittelt sind, konnte für andere Gewebearten bereits gezeigt werden [108].

Die Herabregulierung der PKC auf Genebene kann auch als kompensatorische Antwort auf eine vermehrte Aktivität der Kinase interpretiert werden. Chang *et al.* konnten 2001 zeigen, dass die Stimulation von intestinalem Rattengewebe mit TNF- $\alpha$  eine aktivierende Translokation der PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\zeta$  an die Membran zu Folge hatte, was nahelegt, dass die Cytotoxizität von TNF- $\alpha$  durch einen PKC-abhängigen Signalweg vermittelt wird [109, 110]. Um aufzuklären, inwiefern TNF- $\alpha$  als Modulator der PKC-Aktivität an dem Prozess der septischen Cholestase in humanen Zellen beteiligt ist, sind weitere Versuche zur Membrantranslokation der PKC-Isoformen nötig. Ebenso konnte für IFN- $\gamma$  eine Herabregulierung der PKC-Transkriptrate (vornehmlich  $\alpha$  und  $\iota$ ) beobachtet werden. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  hatte aber weder cytotoxische Effekte, noch zeigte sich ein Einfluss auf die Insertion des MRP2-Transporters in HepaRG-Zellen und lässt einen geringen Einfluss der IFN- $\gamma$ -vermittelten Herabregulierung von PKC  $\alpha$  und  $\iota$  auf die Signaltransduktion der frühen septischen Cholestase vermuten. Auf die Stimulation mit LPS reagierten die Zellen mit einem Anstieg des Laktats und der Translokation von MRP2 ins Cytosol sowie mit einer signifikanten Hochregulierung alleinig der PKC  $\varepsilon$  (**Abbildung 22**).

Dies spricht deutlich für die Beteiligung des, von dieser Kinase aktivierten, Signalwegs an der hepatischen Exkretionsstörung im Zuge einer Sepsis und unterstützt die These von Teppermann *et al.*, die im Jahr 2000 zeigen konnten, dass LPS im Darmepithel der Ratte eine Aktivierung der PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\zeta$  auslöste und vermuteten, dass PKC  $\delta$  und  $\varepsilon$  eine zentrale Rolle in diesem Prozess einnahmen [111]. IL-1 $\beta$  führte zwar zu einer signifikanten Elevation der paraklinischen Verlaufsp Parameter (ASAT  $\uparrow$ , Laktat  $\uparrow$ ), jedoch zu keiner signifikanten Transporter-Translokation. Zusätzlich regulierte IL-1 $\beta$  die PKC  $\alpha$  herab und die PKC  $\varepsilon$  herauf, so dass die Vermutung nahe liegt, dass das Interleukin seine cytotoxischen Effekte über PKC-abhängige Signalwege vermittelt, auf den Rückzug des kanalikulären Galletransporter MRP2 im frühen septischen Geschehen jedoch keinen wesentlichen Einfluss hat. Das Interleukin 6 hatte auf die HepaRG-Zellen cholestatische (MRP2-Dichte an der kanalikulären Membran  $\downarrow$ ) und cytotoxische (Laktat  $\uparrow$ ) Effekte. Eine Regulierung der PKC-Isoformen auf Genexpressionsebene konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass IL-6 ursächlich an der frühen septischen Cholestase beteiligt ist, seine Effekte aber nicht PKC-abhängig vermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beobachteten funktionellen Effekte der Stimulation von HepaRG-Zellen mit den einzelnen Cytokinen auf molekularer Ebene teilweise durch eine PKC-Regulierung auf Genexpressionsebene erklärbar sind.

Insgesamt bewirkten die Cytokine im Rahmen der Zellantwort ein heterogenes Regulationsmuster. TNF- $\alpha$  konnte als einzigem Cytokin in allen ausgewerteten *readouts* (Zellintegrität, molekular und funktionell) signifikante (negative) Effekte nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die, für die frühe hepatische Dysfunktion im Zuge einer Sepsis verantwortlichen Signalwege TNF- $\alpha$ -vermittelt sind.

### 5.6 Die aktivierte Proteinkinase-C bewirkt einen cholestatischen Phänotyp

Im Sepsis-Modell zeigte sich früh eine hepatische Dysfunktion, die scheinbar PKC-vermittelt transkriptionelle und funktionelle Aspekte der Hepatozyten modifizierte und in einer geschädigten Zellintegrität resultierte. Mit dem Ziel verantwortliche Isoformen der PKC Familie zu identifizieren und einen besseren Einblick in die pathophysiologische Signaltransduktion zu erlangen, wurden in dieser Studie die Effekte der PKC-Aktivatoren PMA und Bryostatin 1 in HepaRG-Zellen untersucht. Nach derzeitigem Wissensstand aktiviert der Phorbol ester Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) als Struktur analogon von DAG klassische und neue PKC-Isoformen [112].

Die aktuelle Studienlage erlaubt jedoch keine abschließende Aussage über die choleretischen, cholestatischen oder anticholestatischen Effekte der Aktivierung von spezifischen PKC-Isoformen. Von einer Beteiligung der PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\zeta$  an der Insertion und dem Rückzug von kanalikulären Galletransportern kann zum jetzigen Zeitpunkt aber ausgegangen werden [56, 113]. Corasanti *et al.* konnten bereits 1989 zeigen, dass die Aktivierung der Proteinkinase-C mit Phorbolestern in der perfundierten Rattenleber zur Cholestase führt [114].

Im Jahr 2001 wiesen Kubitz *et al.* in humanen Hepatozyten eine Einschränkung der physiologischen Gallesekretion durch die Aktivierung von klassischen und neuen PKC-Isoformen mit PMA nach. In der humanen Zelllinie (HepG2) zeigten sie innerhalb von 4 Stunden nach PMA-Stimulation den kanalikulären Verlust von MRP2 mit einer begleitenden Einschränkung des Exkretionsvermögens [115]. In Analogie resultierte die Stimulation der hier verwendeten Zelllinie mit PMA in einer gravierenden Schädigung der hepatozellulären Integrität (**Abbildung 34**). Die Aktivierung der Proteinkinase-C führte zu einem Anstieg der paraklinischen Leberparameter, der mit der Reaktion der Parameter auf die experimentelle Sepsis-Induktion vergleichbar war. Die untersuchten Lokalisations- und Funktionsparameter zeigten einen Rückzug des MRP2-Transporters von der kanalikulären Membran ins Cytosol (**Abbildung 46**), jedoch lediglich moderate Einschränkungen der Exkretionsleistung durch die PKC-Aktivierung mit PMA (**Abbildung 55**).

Dies deutet darauf hin, dass die septische Cholestase durch eine PKC-Aktivierung im verwendeten humanen Zellmodell ebenso auslösbar ist wie durch eine Sepsis-Induktion. Die vergleichbare Zellantwort ist ein deutlicher Hinweis auf eine PKC-vermittelte Signaltransduktion der hepatischen Dysfunktion in der frühen Sepsis.

Eine mögliche Erklärung für die geringe exkretorische Funktionseinschränkung durch PKC-Aktivierung könnte die erhöhte Ableserate des MRP2-Transkripts in den ersten 16 Stunden nach PMA-Stimulation geben, die in der vorliegenden Studie beobachtet wurde (**Abbildung 28**). Mayati *et al.* zeigten 2015 in derselben Zelllinie ebenso eine Hochregulierung der MRP2-Genexpression nach 6 stündiger PMA-Stimulation. Eine verringerte Exkretion über MRP2-Transporter wurde erst 48 Stunden nach PMA-Stimulation nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt hatte der PKC-Aktivator auch die Genexpressionsrate von MRP2 signifikant reduziert [57].

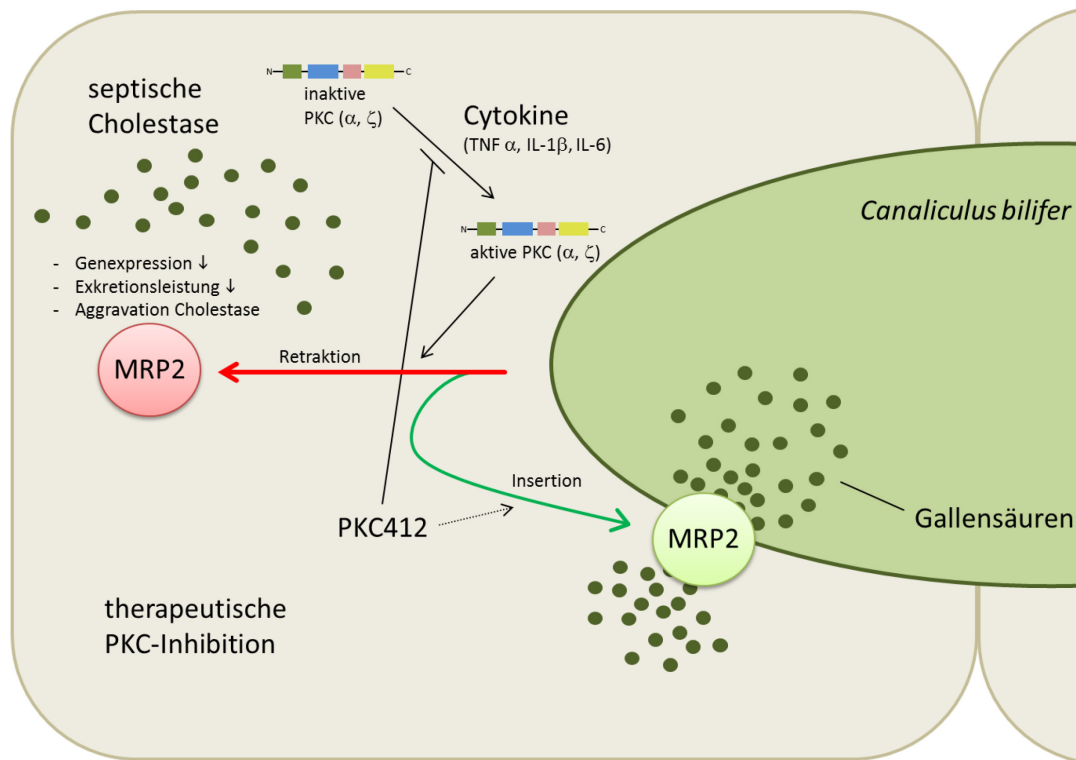


Da Translokationsmechanismen sinusoidaler und kanalikulärer Transporter in Hepatozyten stark post-translational regulierte Ereignisse sind [56], lässt die Zusammenschau dieser Ergebnisse unterschiedliche (gegensätzliche) transkriptionelle und post-transkriptionelle Effekte der PKC-Aktivierung auf den kanalikulären Galletransporter MRP2 vermuten. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich auf genregulatorischer Ebene initial (6h) eine gesteigerte Ableserate der PKC  $\alpha$ ,  $\iota$  und D1 und im Verlauf (16h) eine Abnahme der Expression der PKC  $\alpha$  und  $\iota$  und zusätzlich von  $\delta$  und  $\varepsilon$ . Phänotypisch führte die PKC-Aktivierung zu einer Sepsis-ähnlichen Cholestase; zusätzlich konnten auf Genebene zeit- und isoformspezifische Regulierungen der PKC-Isoformen gezeigt werden (**Abbildung 16**).

Die Ergebnisse unterstreichen die oben aufgestellte These, dass im septischen Geschehen initial atypische und klassische PKC-Isoformen reaktiv ( $\uparrow$  Genexpression PKC  $\alpha$ ,  $\zeta$ ,  $\iota$ ) die Cholestase einleiten und im Verlauf die klassischen und neuen Isoformen adaptiv ( $\downarrow$  Genexpression PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ) mit einer gesteigerten PKC-Aktivität die hepatische Dysfunktion aufrechterhalten. Wie oben bereits erwähnt, ist die Interpretation einer regulierten Genexpression von Kinasen jedoch differenziert zu betrachten. Eine Hochregulierung kann einerseits für eine Signal-vermittelte ‚echte‘ Zunahme oder eine verringerte Aktivität mit reaktiv erhöhter Ableserate darstellen. Genauso wie eine Herabregulierung für eine regulatorisch-vermittelte ‚echte‘ Abnahme der Transkription oder eine kompensatorisch geringe Ableserate bei vermehrter Aktivität stehen kann. Aus diesem Grund wurde auch hier auf die Aktivitäts-nachweisende Membrantranslokation zurückgegriffen. Der PKC  $\alpha$  konnte im Sepsis-Modell bereits nach 6 Stunden eine signifikante Akkumulation an der Membran nachgewiesen werden.

Diese war im Verlauf weiter zunehmend (**Abbildung 32**). Für eine Beteiligung der PKC  $\zeta$  zeigte sich weniger Anhalt. Zwar konnte eine Verlagerung vom Cytosol an die Membran beobachtet werden, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

Die PKC-Aktivierung war für die HepaRG-Zellen cytotoxisch, führte funktionell zum Rückzug des MRP2-Transporters von der kanalikulären Membran und molekular zu einer Heraufregulierung auf Genexpressions- und Proteinebene (**Abbildung 28, 46**). Diese Ergebnisse sprechen für eine PKC-abhängige MRP2-Insertion und unterstützen die Arbeit von Sekine *et al.*, die in perfundierter Rattenleber bereits 2006 die neuen Proteinkinase-C-Isoformen als verantwortlich für die MRP2-Internalisierung identifizierten [44].



**Abbildung 59: Schematische Übersicht der involvierten Pathomechanismen.** Die PKC-Aktivierung, die einem proinflammatorischen Stimulus folgt, resultiert im Rückzug des Galletransporters MRP2 von der kanalikulären Membran ins Cytosol. Zeitgleich kommt es zu einem Polaritätsverlust des Hepatozyten und zu einer Elevation der Zellintegritätsparameter. Der therapeutische Ansatz der PKC Inhibition zur Resolution der septischen Cholestase wird im Fließtext diskutiert.

Naheliegender ist zudem die Vermutung, dass die phänotypisch Sepsis-ähnliche Cholestase, die der PKC-Aktivierung folgt, durch die PKC  $\alpha$  oder einen PKC- $\alpha$ -abhängigen Signalweg vermittelt wird. Phorbolester führen zu einer stabilen Translokation und Verankerung der PKC in der Plasmamembran und folglich zu einer zuverlässigen Aktivierung. Auf diese folgend werden regulatorische Herabregulierungen auf mRNA-Ebene für die unterschiedlichen Isoformen diskutiert [116]. Diese These bestätigend, wurde auch in dieser Arbeit eine vermehrte Aktivität auf Proteinebene simultan zu einer abnehmenden Transkriptrate von PKC  $\alpha$  beobachtet, so dass die Vermutung nahelegt, eine Proteinkinase-C-Aktivierung reguliert ihre eigene Genexpression herab. Für die neuen PKC  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und die atypische PKC  $\iota$  konnte auf Genebene ebenso eine Herabregulierung gezeigt werden. Dies spricht für eine Beteiligung dieser Isoformen an der Signaltransduktion, die die cholestatischen Effekte von PMA im verwendeten Zellmodell vermittelt.

Die Charakterisierung von Aktivierungsprofilen (Membrantranslokation) dieser Isoformen sind zur weiteren Spezifizierung zugrundeliegender Signalwege als vorrangig ausstehende Experimente zu bewerten.

### 5.6.1 Die PKC-abhängige Phosphorylierung von Zellstrukturen in Hepatozyten

In den verwendeten HepaRG-Sphäroiden bildeten sich kanalikuläre Lumina aus, die an der Membran eine Kolokalisation von MRP2 und Radixin aufwiesen. Dies unterstützt die Theorie von Suda *et al.*, dass Radixin das regulierende Strukturprotein der Verankerung und Funktion von MRP2 in der kanalikulären Plasmamembran von Hepatozyten ist [58]. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Membranständigkeit von Radixin in der HepG2 Leberzelllinie (Monolayer) mit einer GFP-Variante dieses Proteins nachgewiesen. Der Zellkern zeigte sich stets Radixin-frei, cytosolisch war abgeschwächt eine Fluoreszenz nachweisbar und an der Membran akkumulierte das fluoreszierende Radixin deutlich.

Um Effekte einer PKC-Aktivierung nachzuweisen, wurden die Zellen mit PMA stimuliert und Fluoreszenz-Shifts aufgezeichnet. Die Aktivierung der Proteinkinase-C zeigte insgesamt nur moderate Effekte auf die Lokalisation von Radixin, führte aber zu einer messbaren Translokation an die Zellmembran (**Abbildung 13**). In der vorliegenden Arbeit konnte eine submembranäre Akkumulation von Radixin nach PKC-Aktivierung gezeigt werden. Die oben diskutierten Ergebnisse (PKC-vermittelte Cholestase) unterstützen in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der Transfektion von GFP-Radixin die Vermutung von Sekine *et al.*, dass die Interaktion von MRP2 und Radixin durch PKC-abhängige Aktivierung vermindert wird und in der Internalisierung des Transporters resultiert [104].

Welche regulatorischen Signalwege der PKC-Aktivierung folgen und welche PKC-Isoform für die Phosphorylierung und Modifizierung der aktinbindenden Proteine verantwortlich ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Bestandteil aktueller Diskussion ist die PKC-abhängige Aktivierung der Phosphatase-1 und die anschließende Dephosphorylierung von Radixin durch diese Phosphatase [56].

### 5.7 Bryostatin 1 - PKC-Aktivator oder PKC-Inhibitor?

Um spezifische Effekte von einzelnen PKC-Isoformen genauer zu differenzieren, wurde zusätzlich zu PMA ein weiterer PKC-Aktivator eingesetzt, für den ein anderes Regulationsprofil beschrieben wurde. Bryostatin 1 gehört einer Gruppe von makrozyklischen Laktonen an, denen ein positiver Effekt als potentes Chemotherapeutikum zugeschrieben wird [117]. Bryostatin 1 reguliert und aktiviert die klassischen und neuen PKC-Isoformen. Das Lakton wird als ‚früher‘ Aktivator und ‚später‘ Inhibitor der Proteinkinase-C bezeichnet [45, 118].

Stanwell *et al.* konnten an zwei humanen Zelllinien (A549 und MCF-7) eine Zunahme der klassischen und neuen Proteinkinase-C in der Membranfraktion innerhalb von 30 Minuten und eine darauffolgende absolute Abnahme innerhalb von 18 Stunden nach Bryostatin 1-Stimulation zeigen [119]. Ähnliche Ergebnisse präsentierten Szallasi *et al.* in murinen Fibroblasten (NIH 3T3). Die Bryostatin 1-Stimulation aktivierte die PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  innerhalb von 2-6 Stunden gefolgt von einer Abnahme der Proteinmenge der PKC gesamt und an der Membran [118]. Beide Studien zeigten keinen Einfluss von Bryostatin 1 auf PKC  $\zeta$ , sondern eine kontinuierlich stabile Expression der atypischen PKC nach der Stimulation.

In der vorliegenden Arbeit hatte die PKC-Modulation mit Bryostatin 1, vergleichbar zu PMA und Cytokinmix, cytotoxische Effekte mit einer signifikanten Elevation der Leberparameter ASAT, LDH und Laktat, sowie eine Abnahme von MRP2 an der kanalikulären Membran zur Folge. Die Genexpression der PKC-Isoformen nach Bryostatin 1-Stimulation zeigte ein ähnliches Regulierungsprofil wie nach Inkubation mit PMA (Herabregulierung von PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\iota$  nach 16h) und lässt eine Beteiligung dieser Isoform an den cholestatischen Effekten von Bryostatin 1 vermuten. Die Membranfraktionierung lieferte jedoch größtenteils mit den Experimenten von Stanwell *et al.* und Szallasi *et al.* übereinstimmende Ergebnisse. Anders als bei PMA ging bei Bryostatin 1 die Herabregulierung der Genexpression mit einer simultanen Abnahme der PKC  $\alpha$  an der Membran einher. Bereits nach 6 Stunden kam es zu einer signifikanten Reduktion der cytosolischen PKC  $\alpha$  ohne eine Zunahme in der Aktivität-anzeigenden Membranfraktion (**Abbildung 32**). Im Totallysat konnte eine Abnahme der Gesamtproteinmenge von PKC  $\alpha$  nach 16 Stunden beobachtet werden. Dies lässt eine proteolytische Komponente der Bryostatin 1-Stimulation vermuten. In der vorliegenden Arbeit konnte Bryostatin 1 als Inhibitor (Transkript  $\downarrow$  und Protein  $\downarrow$ ) der PKC  $\alpha$  in der humanen Leberzelllinie (HepaRG) identifiziert werden (**Abbildung 17**).

Die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit unterscheiden sich aber in Bezug auf die Regulation der atypischen PKC  $\zeta$  durch Bryostatin 1 von den oben genannten Veröffentlichungen. Sechs Stunden nach Stimulation wurde eine aktivierende Membrantranslokation der PKC  $\zeta$  erfasst (**Abbildung 33**). Dies spricht für eine Beteiligung der PKC  $\zeta$  an der beobachteten Lokalisationsänderung von MRP2. Die Aktivierung der PKC  $\zeta$  konnte im verwendeten Zellmodell sowohl signifikant für den Cytokinmix als auch nicht-signifikant für PMA beobachtet werden. Diese Erkenntnis bekräftigt die Theorie, dass die atypische PKC  $\zeta$  im Zuge des frühen septischen Geschehens wesentlich in die Signalverarbeitung involviert ist.

### 5.8 Die PI3K $\gamma$ ist in die Signalkaskade der frühen septischen Cholestase involviert

Die Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) und die durch sie aktivierte PI3K $\gamma$ -Akt/PKB Signalkaskade sind häufiger Bestandteil der Diskussion über die Sepsis-assoziierte Cholestase. Recknagel *et al.* konnten 2012 PI3K $\gamma$  als einen molekularen Hauptfaktor der Sepsis-assoziierten, exkretorischen Dysfunktion identifizieren. Sie konnten zeigen, dass PI3K $\gamma^{-/-}$  Knockout-Mäuse 6 Stunden nach Sepsis-Induktion geringere Anzeichen einer Cholestase entwickelten und vor der hepatischen Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten geschützt waren [30]. Ein Zusammenhang der beiden Signalwege PI3K $\gamma$ -Raf-MAPK-Erk1/2 und PKC-p38MAPK wurde im gleichen Jahr von Boaglio *et al.* beschrieben. Die durch das Östrogen-Metabolit E17G induzierte Cholestase vermittelte seine Effekte komplementär über beide Signalwege und führte zu einer Internalisierung und einer verstärkten intrazellulären Retention des MRP2-Transporters [38].

Um die Zusammenhänge zwischen den beiden Signalwegen genauer zu untersuchen, wurde die Stimulation mit *NfMLP*, einem Aktivator der PI3K $\gamma$  [120], mit einbezogen. Zusätzlich wurde AS605240 als potenter und selektiver PI3K $\gamma$ -Inhibitor verwendet [121, 122]. Die Aktivierung der PI3K $\gamma$  resultierte im verwendeten Modell nicht in einer Cholestase. Die exkretorische Funktionsleistung und hepatische Zellintegrität der verwendeten HepaRG-Zellen wurde durch die Aktivierung nicht reduziert. Die singuläre Aktivierung des PI3K $\gamma$ -Signalweges führte zum Rückzug der kanalikulären MRP2 von der Membran der HepaRG-Zellen, mit einer (möglicherweise reaktiv) gesteigerten MRP2 Expressionsrate, welche jedoch nicht detailliert untersucht wurde. Die Genexpressionsanalyse offenbarte die Aktivierung von PI3K $\gamma$  als potenten Repressor der PKC-Isoformen (**Abbildung 18**). An der Membran jedoch aktivierte PI3K $\gamma$  nachweislich PKC  $\alpha$  und PKC  $\zeta$ . Die klassische PKC  $\alpha$  hatte über 16 Stunden eine signifikant erhöhte Aktivität. Initial (6h) war auch die PKC  $\zeta$  an die Membran transloziert. Die erläuterten Ergebnisse sprechen für einen deutlichen Zusammenhang der beiden Kinasen PI3K $\gamma$  und PKC in der Signalverarbeitung der frühen septischen Cholestase. Die PI3K $\gamma$  Aktivierung führt wie der Cytokinmix, PMA und Bryostatin 1 zu einer Translokation von MRP2. Die deutliche Aktivierung der PKC  $\alpha$  und  $\zeta$  an der Membran, die hier wie bei PMA mit einer Herabregulierung auf Genexpressionsebene reagiert, lässt vermuten, dass der Effekt von PI3K $\gamma$  auf die Retention des kanalikulären Transporters in der verwendeten Zellreihe PKC vermittelt ist.

Interessanterweise resultierte die Inhibition von PI3K $\gamma$  wie die Aktivierung in einem vermehrten MRP2-Rückzug ins Cytosol allerdings ohne die MRP2-Genexpressionsrate zu regulieren. Zusätzlich war ein Anstieg des Enzyms ASAT zu verzeichnen. Zwar regulierte AS605240 auf molekularer Ebene die gesteigerte Genexpression der PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  im septischen Geschehen herab, diese Regulierung blieb jedoch ohne Konsequenz für die funktionellen Aspekte der Hepatozyten. In der vorliegenden Arbeit konnte der PI3K $\gamma$ -Inhibition keine positiv modulierende Eigenschaft nachgewiesen werden, die zu einer Verbesserung der hepatischen Dysfunktion im proinflammatorischen Geschehen geführt hätte. Die diskutierten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die PI3K $\gamma$  nicht alleine für die pathologische Signaltransduktion der frühen septischen Cholestase verantwortlich gemacht werden kann und von einer therapeutischen Inhibition wenig positive Effekte auf die frühe septische Cholestase zu erwarten sind. Die PI3K $\gamma$ /Akt-Signalkaskade sollte Bestandteil zukünftiger Studien sein, um die Aufgaben und das Mitwirken an der Signalweiterleitung in der septischen Leber zu definieren.

### 5.9 PKC-Inhibition als therapeutisches Konzept

In der vorliegenden Studie sollten nicht nur molekulare Grundlagen der Signalverarbeitung charakterisiert, sondern auch ein therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Cholestase in der Sepsis untersucht werden. Die Inhibition von PKC-Isoformen und ihren spezifischen Signalwegen ist ein vielversprechender Ansatz, der besonders seit den Erfolgen der Tyrosinkinase Inhibitoren Teil der aktuellen Diskussion ist [45]. Das Sepsis-Modell sowie die Aktivierung der Proteinkinase-C hatte deutlich negative Effekte auf die Exkretionsleistung der verwendeten Hepatozyten. Die Theorie, dass eine PKC-Inhibition die frühe septische Cholestase zumindest in Teilen positiv beeinflussen kann, war naheliegend. In einem vergleichbaren Ansatz von Borgogne *et al.* konnte im Jahr 2005 nachgewiesen werden, dass eine Modulation der pathologischen Signaltransduktion durch PKC-Inhibitoren möglich ist. Eine PKC-Inhibition milderte die durch bestimmte Gallensalze induzierte, hepatische Nekrose in isolierten Rattenhepatozyten signifikant [43]. Eine vergleichbare PKC-Inhibition wurde in dieser Arbeit durch die Verwendung von Gö6850, Gö6976 und PKC412 erreicht.

### 5.9.1 Gö6850

Kubitz *et al.* konnte in humanen HepG2-Zellen zeigen, dass eine PKC-Aktivierung den Rückzug von kanalikulären MRP2-Transportern ins Cytosol der Zellen auslöste. Der PKC-Inhibitor Gö6850 (Bisindolylmaleimid 1) konnte in dieser 2001 veröffentlichten Studie die Effekte der Proteinkinase-C nahezu vollständig verhindern und schützte MRP2 vor der cytosolischen Retraktion [115]. Gö6850 ist als prädominanter PKC-Inhibitor beschrieben, der besonders potent die klassischen und neuen Isoformen reguliert ( $\alpha > \beta I > \delta > \varepsilon > \zeta$ ) [123, 124]. In der hier verwendeten Zellreihe regulierte Gö6850 die Transkriptionsrate aller PKC-Isoformen herab. Die Regulierung entsprach auf Genexpressionsebene im Wesentlichen den von Toulecc *et al.* und Jacoboson *et al.* beschriebenen Ergebnissen ( $\alpha > \delta > \varepsilon > \theta > \iota > D1 > \eta > \zeta$ , siehe Tabelle im Anhang).

Der PKC-Inhibitor hatte keine cytotoxischen Effekte und führte zu keiner MRP2-Translokation. Er schränkte jedoch die funktionelle Exkretion über den kanalikulären Transporter ein (**Abbildung 56**). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gö6850 in HepaRG-Zellen auf Genexpressionsebene eine Herabregulierung der Proteinkinase-C vermittelt. Eine singuläre Inhibition des PKC Signalwegs scheint wenig negative Effekte auf die Hepatozyten zu haben. Dies sprach dafür, Gö6850 im septischen Geschehen als therapeutischen PKC-Inhibitor experimentell zu untersuchen. Im Sepsis-Modell zeigte sich jedoch auf die cytosolische Translokation von MRP2 kein positiver Einfluss durch den Einsatz von Gö6850 als PKC-Inhibitor, die Exkretionsleistung verschlechterte sich sogar. Die Regulierung der PKC- und MRP2- Genexpression im inflammatorischen Geschehen konnte mit dem Inhibitor nicht beeinflusst werden. Alleine die Elevation von LDH wurde mit Gö6850 verhindert. Die ausbleibende Verbesserung der frühen septischen Cholestase durch die PKC-Inhibition mit Gö6850 deutet darauf hin, dass diese durch die weniger inhibierten Isoformen vermittelt sein könnte. Diese Erkenntnis geht mit den Ergebnissen aus der Membranfraktionierung einher und bekräftigt die Theorie, dass die Proteinkinase  $\zeta$  eine der hauptverantwortlichen Kinasen in der Signalkaskade des frühen septischen Geschehens ist. In der Kostimulation mit dem PKC-Aktivator PMA hatte Gö6850 positive Effekte auf die Cytotoxizität (ASAT und LDH wieder normwertig, **Abbildung 34**). Für die funktionellen Parameter konnte jedoch ebenso keine Verbesserung nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene zeigte Gö6850 keine Modulation des Regulationsmusters der PKC-Aktivierung. Dies spricht dafür, dass die cholestatischen Effekte einer PKC-Aktivierung in der frühen Sepsis mit Gö6850 nicht wesentlich positiv beeinflusst werden können.

Eine Vermittlung dieser Effekte findet, wie in der proinflammatorischen Umgebung, über die weniger inhibierten Anteile der Proteinkinase-C ( $\eta$ ,  $\iota$  und  $\zeta$ ) statt. Da die cytotoxischen Auswirkungen der aktivierten PKC Signalwege sich jedoch mit dem PKC-Inhibitor positiv modulieren lassen, kann man davon ausgehen, dass diese durch die stärker inhibierten PKC-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\theta$ ) ausgelöst werden. So konnte Gö6850 die Elevation von ASAT, LDH und Laktat auch nach Bryostatin 1-Stimulation signifikant revidieren (**Abbildung 35**). Zum gleichen Zeitpunkt (16h) konnte eine signifikante Herabregulierung der Genexpression von PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  durch Gö6850 nach Bryostatin 1-Stimulation nachgewiesen werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die cytotoxischen Effekte durch diese Isoformen signalisiert werden. Funktionell resultierte die Kostimulation mit Gö6850 jedoch in einer signifikanten Abnahme der Exkretionsleistung und cytosolischen Translokation des MRP2-Transporters. Die Aktivierung der PKC  $\zeta$  durch Bryostatin 1 und die geringe Inhibition durch Gö6850 spricht für die Vermittlung der beobachteten Cholestase durch diese Isoform. Die Aktivierung der PI3K $\gamma$  gemeinsam mit einer PKC-Inhibition (Gö6850) führte zu einer signifikanten Verschlechterung der Exkretionsleistung und zu keiner Verbesserung der MRP2-Translokation.

Da der aktivierte PI3K $\gamma$ /Akt Signalweg alleine kein Exkretionsdefizit verursachte, suggeriert dieses Ergebnis, dass durch Gö6850 inhibierte Anteile der PKC-Signaltransduktion in Bezug auf die PI3K $\gamma$ /Akt Signaltransduktion auch protektiv wirksam sein könnten.

### 5.9.2 Gö6976

Mit Gö6979 wurde ein weiterer PKC-Inhibitor eingesetzt, für den eine spezifische Aktivitätsabnahme der klassischen, kalziumabhängigen PKC-Isoformen beschrieben wurde [125]. In der vorliegenden Arbeit senkte Gö6976 als PKC-Inhibitor die Transkriptionsrate der PKC-Isoformen in HepaRG-Zellen ( $\delta > \alpha > \varepsilon > \theta > D1 > \iota > \eta > \zeta$ , siehe Tabelle im Anhang). Zudem zeigte sich nach Gö6976-Stimulation ein signifikantes Exkretionsdefizit des MRP2-Transporters in den verwendeten HepaRG-Zellen. Dies spricht dafür, dass die, durch Gö6976 wahrscheinlich weniger inhibierten, neuen und atypischen PKC-Isoformen für die Regulation der Exkretion verantwortlich sind. Weder im angewendeten Sepsis-Modell noch nach singulärer PKC-Aktivierung konnte Gö6976 die ausgewerteten Parameter in den Hepatozyten positiv beeinflussen.



Die cholestatischen Effekte wurden scheinbar nicht über die inhibierten PKC-Isoformen ausgelöst. Die Elevation der Integritätsparameter nach Bryostatin 1-Stimulation konnte durch die PKC-Inhibition mit Gö6976 signifikant gesenkt werden (**Abbildung 35**). Genregulatorisch führt Gö6976 in der Bryostatin 1-Gruppe gleichzeitig zu einer signifikanten Abnahme der Expressionsrate der PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\iota$  und D1. Dies spricht dafür, dass die Cytotoxizität der PKC-Modulatoren, wie weiter oben vermutet, über diese PKC-Isoformen signalisiert werden. Die Aktivierung des PI3K $\gamma$ /Akt Signalweges resultierte mit simultaner PKC-Inhibition durch Gö6976 (wie bei Gö6850) in einer signifikanten Verschlechterung der Exkretionsleistung. Dies bekräftigt die oben aufgestellte Theorie, dass die PKC Signalkaskade auch physiologisch schützende Anteile beinhaltet. Die in dieser Studie nachgewiesene, geringe Herabregulierung der PKC  $\eta$  und  $\zeta$  Genexpression durch PKC-Inhibitoren lässt eine Verantwortung dieser für die cholestatischen Effekte im septischen Geschehen vermuten (**Abbildung 23, 25**). Mayati *et al.* konnten 2015 positive Effekte der PKC-Inhibitoren Gö6850 und Gö6976 auf die PMA-regulierte Abnahme der Expression von hepatischen Galletransportern nachweisen [57]. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung für den kanalikulären MRP2-Transporter nicht bestätigt werden. Die Inhibitoren konnten die Lokalisation und Funktionalität des Transporters im Sepsis-Modell nicht positiv modulieren.

Weitere Experimente könnten die inhibierenden Eigenschaften von Gö6850 und Gö6976 besser charakterisieren. Um genauere Aussagen über die Inhibitionsspezifität der Substanzen treffen zu können, wäre das Immunoblotting der subzellulären Fraktionen auf PKC-Isoformen nach Stimulation mit den PKC-Inhibitoren hilfreich und könnte in weiteren Studien verfolgt werden. Die hier diskutierten Ergebnisse sprechen aber aufgrund der fehlenden Inhibition der atypischen Isoformen nicht für einen Einsatz der PKC-Inhibitoren zur Therapie der frühen septischen Cholestase.

### 5.9.3 PKC412

Ein weiterer therapeutischer Ansatz, spezifisch PKC-Isoformen zu hemmen und so Einfluss auf die PKC-vermittelte septische Cholestase auszuüben, war der Einsatz von PKC412. Dieser Breitspektrum Proteinkinase-C-Inhibitor ist in Midostaurin enthalten [126], ein Wirkstoff, der sich zum jetzigen Zeitpunkt in Phase 3 einer klinischen Studie gegen Akute Myeloische Leukämie befindet [127]. Für PKC412 ist eine für diese Studie relevante Inhibition der PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\eta$  sowie eine Inhibition der von diesen PKC-aktivierten Signalwege beschrieben [45].

In der hier verwendeten Leberzelllinie führte PKC412 zu einer signifikanten Herabregulierung der PKC  $\delta$  ( $\log_2$  fold change  $\delta$ : -1,972) und einer schwachen Heraufregulierung der PKC  $\eta$  und  $\zeta$  ( $\log_2$  fold change  $\eta$ : 0,310,  $\zeta$ : 0,250). Die PKC-Modulation hatte keine cytotoxischen Effekte oder Auswirkungen auf die Genexpression und Translokation von MRP2; die Exkretionsleistung war im Vergleich zu Kontrolle jedoch signifikant gesteigert (**Abbildung 56**). PKC412 erfüllte die Voraussetzungen, um im verwendeten Modell als PKC-Modulator eingesetzt zu werden. Die Steigerung der Exkretionsleistung konnte als positive Eigenschaft gewertet werden und war mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Regulation der PKC-Isoformen  $\delta$ ,  $\eta$  und  $\zeta$  zurückzuführen. Die Aktivierung der PKC führte in den HepaRG-Zellen zu einer Elevation der Leberparameter ASAT, LDH und Laktat und zu einer Cholestase. Durch die Zugabe von PKC412 erreichten diese Werte das Kontrollniveau (**Abbildung 34**). Die Heraufregulierung der Genexpression sowie die Translokation von MRP2 von der kanalikulären Membran ins Cytosol, die einer PKC-Aktivierung folgte, konnte mit PKC412 korrigiert werden (**Abbildung 28, 46**). Auch die Exkretionsleistung des Galletransporters stieg signifikant an. Simultan zu dieser mehrheitlich funktionell verbesserten Zellantwort konnten auf molekularer Ebene eine deutliche Abnahme der Genexpression von PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\theta$  und eine Zunahme der Transkriptrate von PKC  $\zeta$  festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Hepatozyten, in denen spezifisch die Proteinkinase-C aktiviert worden war, PKC412 deutlich positive Auswirkungen auf die sich entwickelnde Cholestase hatte.

Dies lässt darauf schließen, dass PKC412 effektiv die Isoformen inhibiert, die für die PKC-vermittelte Cholestase verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu diesen ermutigenden Befunden waren die positiven Effekte von PKC412 im Sepsis-Modell weniger deutlich zu beobachten. Dort konnte durch die PKC-Inhibition zwar die Elevation der LDH revidiert werden (**Abbildung 38**), auf die untersuchte Translokation und Exkretionsleistung von MRP2 war jedoch kein signifikanter Einfluss nachweisbar. PKC412 regulierte die in proinflammatorischer Umgebung gesteigerte Genexpression von PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  signifikant herab. Diese Ergebnisse entsprechen nur zum Teil den erhofften positiven Auswirkungen einer PKC-Inhibition. Durch eine PKC-Inhibition mit PKC412 konnte die Elevation der klinisch-chemischen Parameter teilweise reduziert und die PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  herabreguliert werden. Diese Beobachtung liefert Hinweise auf die Verantwortung dieser Isoformen an der ursächlichen, pathomechanistisch relevanten Signaltransduktion, die zu einer Verschlechterung der hepatozytären Integrität führte.

PKC412 war in der Lage die Zellintegrität der Hepatozyten nach PKC-Aktivierung zu wahren und die PKC-vermittelte Cholestase zu korrigieren. Auf die frühe septische Cholestase konnten jedoch nur geringe Effekte gezeigt werden. Die ausbleibende Verbesserung der hepatozellulären Dysfunktion durch PKC412 im Sepsis-Modell könnte darauf zurückführbar sein, dass die Isoformen  $\eta$ ,  $\theta$  und  $\zeta$  in der verwendeten Zelllinie nicht ausreichend reguliert wurden. In weiteren experimentellen Untersuchungen sollten weitere Dosierungen des Inhibitors im Sepsis-Modell angewendet und die Aktivierungsprofile (Membrantranslokation) der PKC-Isoformen auf Proteinebene untersucht werden. Im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten PKC-Inhibitoren Gö6850 und Gö6976 sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für PKC412 als eine vielversprechende Variante der PKC-Inhibition, um die frühe hepatische Dysfunktion in der Sepsis zu kausal zu behandeln.

### 5.10 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung der Proteinkinase-C an der frühen septischen Cholestase und die Möglichkeit einer therapeutischen Inhibition untersucht.

Das in der verwendeten Zelllinie etablierte Sepsis-Modell bot ideale Voraussetzungen, um Hinweise auf die zu Grunde liegenden Pathomechanismen der hepatischen Dysfunktion zu erlangen. Zudem konnten unterschiedliche proinflammatorische Bestandteile des septischen Geschehens und ihre Beteiligung an der exkretorischen Dysfunktion charakterisiert werden. Die experimentelle Sepsis löste in den Hepatozyten eine Inflammation aus, die zu einer signifikanten Elevation der paraklinischen Laborwerte führte. Interleukin-1 $\beta$  konnte in dieser Arbeit als ein verantwortliches Cytokin für die septische Cytotoxizität in HepaRG-Zellen identifiziert werden. Die ausgewerteten Parameter waren in der Lage, das Ausmaß einer Cholestase funktionell aus Lokalisationsänderung sowie Exkretionsdefizit des kanalikulären Galletransporter MRP2 zu definieren. Im septischen Geschehen konnte gezeigt werden, dass sich eine Cholestase bereits 6 Stunden nach dem Initialereignis manifestierte.

Ursächlich für die fehlerhafte Translokation der Galletransporter im proinflammatorischen Geschehen war am wahrscheinlichsten der gezeigte Polaritätsverlust in den Hepatozyten. Die qPCR und die Fraktionierung der Zellen in membranäre und cytosolische Fraktion gab Aufschluss über die, der frühen exkretorischen Dysfunktion zu Grunde liegenden, pathologischen Signale. Die molekularen *readouts* der Zellantwort wiesen isoformspezifische und zeitabhängige Effekte nach, die an der Entwicklung einer Cholestase im Sepsis-Modell involviert waren. Im initialen septischen Geschehen änderte die Proteinkinase-C  $\zeta$  ihre Lokalisation zu Membran hin. Diese aktivierende Membrantranslokation deckte die Beteiligung an der hepatischen Dysfunktion auf. Der PKC  $\alpha$  konnte eine kontinuierlichere Aktivitätssteigerung im septischen Geschehen und ein relevantes Mitwirken der von ihr abhängigen Signalkaskade an den pathophysiologischen Vorgängen im frühen Verlauf der septischen Cholestase nachgewiesen werden. Aus der Vielzahl an der Sepsis ursächlich beteiligten Transmitter konnte TNF  $\alpha$  eine entscheidende Rolle an der PKC-vermittelten Entstehung der exkretorischen Dysfunktion zugeschrieben werden. Anhand von etablierten Aktivatoren einzelner Kinasen wurden spezifische Signalwege und die Effekte auf die exkretorische Funktion in den verwendeten Hepatozyten charakterisiert und mit den Ergebnissen aus dem Sepsis-Modell verglichen.

So konnte gezeigt werden, dass die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  vor allem cytotoxische Effekte in den Hepatozyten signalisierten, cholestatische Effekte aber an erster Stelle durch die Isoformen  $\alpha$ ,  $\eta$  und  $\zeta$  kommuniziert wurden. Der erbrachte Nachweis, dass eine Proteinkinase-C-Aktivierung kausal in Zusammenhang mit dem septischen Leberversagen steht, bot die Möglichkeit, neue therapeutische Konzepte zu entwerfen und im angewendeten Modell zu untersuchen. Die PKC-Inhibition mit PKC412 zeigte signifikant positive Ergebnisse und kann als vielversprechende Option zur Verbesserung der frühen exkretorischen Dysfunktion in der Sepsis in weiteren Studien verfolgt werden.

Es bleibt nicht umhin gewisse Restriktionen in der vorliegenden Arbeit anzuerkennen. Aufgrund der artifiziellen Bedingungen *in vitro* sind die Ergebnisse nur begrenzt auf ein komplexes Geschehen *in vivo* übertragbar. Zellkultursysteme ermöglichen ausgedehnte Versuchsreihen mit weitgehend unverändertem Ausgangsmaterial und eine exakte Kontrolle der Einflussfaktoren. Der Einsatz kann den Bedarf an Tierversuchen reduzieren, häufig müssen die Ergebnisse aber an Tieren verifiziert werden.

Das *tissue engineering* in HepaRG-Sphäroiden wurde in dieser Arbeit etabliert, um die Bedingungen *in vivo* möglichst genau zu replizieren. Die HepaRG-Zellreihe bat dafür, mit der physiologischen Differenzierung in zwei Zelltypen, die optimalen Voraussetzungen. Zellkulturen eignen sich besonders für die Analyse zellulärer Parameter, die unabhängig von systemischen Faktoren sind. An den Prozessen der Signalübertragung, -verarbeitung und der zellinternen Kommunikation ist oft eine Vielzahl von Enzymen und *second messengern* beteiligt, die gemeinsam Teil einer Signalkaskade zur Weiterleitung von äußeren Reizen sind. Da humane Zellen ihre Mechanismen zur Signalverarbeitung höchst spezifisch modulieren können, ist die Erforschung von Signalwegen nicht nur ein weiter und komplizierter, sondern auch ein verhältnismäßig junger, innovativer Bereich der Molekularbiologie, den es zu erschließen gilt.

Die angefertigte Arbeit liefert Hinweise auf grundlegende Pathomechanismen der Signalkaskade im frühen septischen Geschehen und somit einen Beitrag zur Entschlüsselung des klinischen Phänomens ‚Sepsis‘. Weitere Studien zur Beteiligung der Proteinkinase-C an der frühen septischen Cholestase sollten angestrebt werden, um tiefere Einblicke in die pathologische Signaltransduktion zu erhalten. Nicht zuletzt sollte die PKC-Inhibition mit PKC412 als therapeutisch kausaler Ansatz Gegenstand weiterer Forschungsbemühungen sein, um zeitnah das Behandlungsspektrum der Sepsis-Therapie zu erweitern und die anhaltend hohe Mortalitätsrate zu senken.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Singer, M., et al., *The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-810.
2. Fleischmann, C., et al., *Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus*. Dtsch Arztebl International, 2016. **113**(10): p. 159-66.
3. Kaukonen, K., et al., *Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in australia and new zealand, 2000-2012*. JAMA, 2014. **311**(13): p. 1308-1316.
4. Fan, S.-L., et al., *Diagnosing sepsis – The role of laboratory medicine*. Clinica Chimica Acta, 2016. **460**: p. 203-210.
5. Faix, J.D., *Biomarkers of sepsis*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2013. **50**(1): p. 23-36.
6. Vincent, J.L., et al., *Sepsis definitions: time for change*. Lancet, 2013. **381**(9868): p. 774-5.
7. Vincent, J.L., et al., *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine*. Intensive Care Med, 1996. **22**(7): p. 707-10.
8. Ferreira, F.L., et al., *Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients*. JAMA, 2001. **286**(14): p. 1754-8.
9. Shankar-Hari, M., et al., *Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 775-787.
10. Seymour, C.W., et al., *Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 762-74.
11. Bone, R.C., et al., *Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-1655.
12. Bone, R.C., C.J. Grodzin, and R.A. Balk, *Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process*. Chest, 1997. **112**(1): p. 235-243.
13. Xiao, W., et al., *A genomic storm in critically injured humans*. J Exp Med, 2011. **208**(13): p. 2581-90.
14. Bhan, C., et al., *Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis*. Inflammation Research, 2016. **65**(11): p. 853-868.
15. Reinhart, K., et al., *New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(4): p. 609-34.
16. Kumar, A., *An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 80-97.
17. Chand, N. and A.J. Sanyal, *Sepsis-induced cholestasis*. Hepatology, 2007. **45**(1): p. 230-41.
18. Kramer, L., et al., *Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study*. Crit Care Med, 2007. **35**(4): p. 1099-104.
19. Geier, A., P. Fickert, and M. Trauner, *Mechanisms of disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(10): p. 574-85.

20. Trauner, M., P. Fickert, and R.E. Stauber, *Inflammation-induced cholestasis*. J Gastroenterol Hepatol, 1999. **14**(10): p. 946-59.
21. Pastor, C.M. and P.M. Suter, *Hepatic hemodynamics and cell functions in human and experimental sepsis*. Anesth Analg, 1999. **89**(2): p. 344-52.
22. Luster, M.I., et al., *Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver*. Hepatology, 1994. **19**(2): p. 480-8.
23. Roelofsen, H., et al., *Impaired hepatocanalicular organic anion transport in endotoxemic rats*. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 1): p. G427-34.
24. Jones, A., et al., *Tumor-Necrosis-Factor, Cholestatic Jaundice, and Chronic Liver-Disease*. Gut, 1990. **31**(8): p. 938-939.
25. Trauner, M., et al., *Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis*. J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(4 Suppl 2): p. S111-24.
26. Limdi, J. and G. Hyde, *Evaluation of abnormal liver function tests*. Postgraduate Medical Journal, 2003. **79**(932): p. 307-312.
27. Iskander, K.N., et al., *Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding*. Physiol Rev, 2013. **93**(3): p. 1247-88.
28. Zein, J.G., et al., *Prognostic significance of elevated serum lactate dehydrogenase (ldh) in patients with severe sepsis*. Chest, 2004. **126**(4\_MeetingAbstracts): p. 873S-873S.
29. De Leeuw, A.M., A. Brouwer, and D.L. Knook, *Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age*. J Electron Microsc Tech, 1990. **14**(3): p. 218-36.
30. Recknagel, P., et al., *Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis*. PLoS Med, 2012. **9**(11): p. e1001338.
31. Roma, M.G., F.A. Crocenzi, and A.D. Mottino, *Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(44): p. 6786-801.
32. Stanca, C., et al., *Hepatocellular transport proteins and their role in liver disease*. World Journal of Gastroenterology, 2001. **7**(2): p. 157-169.
33. Memon, N., et al., *Inherited disorders of bilirubin clearance*. Pediatr Res, 2016. **79**(3): p. 378-86.
34. Kortgen, A., et al., *Prospective assessment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill*. Shock, 2009. **32**(4): p. 358-65.
35. Geier, A., et al., *Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 345-54.
36. Hisaeda, K., et al., *Interleukin-1 $\beta$  represses MRP2 gene expression through inactivation of interferon regulatory factor 3 in HepG2 cells*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1574-1582.
37. Park, S.W., et al., *Rab11, but not Rab4, facilitates cyclic AMP- and tauroursodeoxycholate-induced MRP2 translocation to the plasma membrane*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2014. **307**(8): p. G863-G870.

38. Boaglio, A.C., et al., *ERK1/2 and p38 MAPKs are complementarily involved in estradiol 17 $\alpha$ -D-glucuronide-induced cholestasis: crosstalk with cPKC and PI3K*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49255.
39. Beuers, U., et al., *Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver*. Hepatology, 2001. **33**(5): p. 1206-1216.
40. Beuers, U., et al., *Modulation of protein kinase C by tauroithocholic acid in isolated rat hepatocytes*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 477-82.
41. Vore, M., Y. Liu, and L. Huang, *Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides*. Drug Metab Rev, 1997. **29**(1-2): p. 183-203.
42. Mühlfeld, S., et al., *Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver*. Hepatology, 2012. **56**(6): p. 2387-97.
43. Borgognone, M., et al., *Signaling Modulation of Bile Salt-Induced Necrosis in Isolated Rat Hepatocytes*. Toxicological Sciences, 2005. **83**(1): p. 114-125.
44. Sekine, S., K. Ito, and T. Horie, *Oxidative stress and Mrp2 internalization*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **40**(12): p. 2166-2174.
45. Mackay, H.J. and C.J. Twelves, *Targeting the protein kinase C family: are we there yet?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(7): p. 554-562.
46. Newton, A.C., *Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(48): p. 28495-28498.
47. Coussens, L., et al., *Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways*. Science, 1986. **233**(4766): p. 859-866.
48. Selbie, L.A., et al., *Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(32): p. 24296-24302.
49. Johannes, F.J., et al., *PKC $\epsilon$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family*. J Biol Chem, 1994. **269**(8): p. 6140-8.
50. Valverde, A.M., et al., *Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8572-6.
51. Rey, O., et al., *Protein kinase C  $\alpha$ /protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23773-85.
52. Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J, 1995. **9**(8): p. 576-96.
53. Xu, Z.-B., et al., *Catalytic Domain Crystal Structure of Protein Kinase C- $\theta$  (PKC $\theta$ )*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(48): p. 50401-50409.
54. Newton, A.C., *Interaction of Proteins With Lipid Headgroups: Lessons from Protein Kinase C*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1993. **22**(1): p. 1-25.
55. Csukai, M. and D. Mochly-Rosen, *Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localisation*. Pharmacol Res, 1999. **39**(4): p. 253-9.



56. Anwer, M.S., *Role of protein kinase C isoforms in bile formation and cholestasis*. Hepatology, 2014. **60**(3): p. 1090-7.
57. Mayati, A., et al., *Protein kinase C-dependent regulation of human hepatic drug transporter expression*. Biochem Pharmacol, 2015. **98**(4): p. 703-17.
58. Suda, J., D.C. Rockey, and S. Karvar, *Phosphorylation dynamics of radixin in hypoxia-induced hepatocyte injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **308**(4): p. G313-24.
59. Karvar, S., et al., *Distribution dynamics and functional importance of NHERF1 in regulation of Mrp-2 trafficking in hepatocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **307**(8): p. C727-37.
60. Hoeflich, K.P. and M. Ikura, *Radixin= cytoskeletal adopter and signaling protein*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2131-6.
61. Amieva, M.R., *Radixin is a component of rat hepatocyte microvilli in Situ*. Experimental Cell Research, 1994.
62. Kawase, A., *[Alterations in expression and function of ABC transporters and ERM proteins in inflammation]*. Yakugaku Zasshi, 2014. **134**(9): p. 925-9.
63. Kikuchi, S., et al., *Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes*. Nat Genet, 2002. **31**(3): p. 320-5.
64. Kojima, H., et al., *Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis*. Journal of Hepatology, 2003. **39**(5): p. 693-702.
65. Ito, K., T. Wakabayashi, and T. Horie, *Mrp2/Abcc2 transport activity is stimulated by protein kinase C $\alpha$  in a baculo virus co-expression system*. Life Sciences, 2005. **77**(5): p. 539-550.
66. Suda, J., D.C. Rockey, and S. Karvar, *Akt2-Dependent Phosphorylation of Radixin in Regulation of Mrp-2 Trafficking in WIF-B Cells*. Digestive Diseases and Sciences, 2015.
67. Perez, L.M., et al., *Oxidative stress induces internalization of the bile salt export pump, Bsep, and bile salt secretory failure in isolated rat hepatocyte couplets: a role for protein kinase C and prevention by protein kinase A*. Toxicol Sci, 2006. **91**(1): p. 150-8.
68. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science, 1980. **209**(4455): p. 497-9.
69. Gripon, P., et al., *Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15655-60.
70. Gunness, P., et al., *3D organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for in vitro toxicity studies*. Toxicol Sci, 2013. **133**(1): p. 67-78.
71. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical Biochemistry, 1987. **162**(1): p. 156-159.
72. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Molecular Aspects of Medicine, 2006. **27**(2-3): p. 126-139.
73. Vermeulen, J., et al., *Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(9): p. e63.
74. HEID, C.A.S., J. ; LIVAK, K. J. ; WILLIAMS, P. M., *Real time quantitative PCR*. Genome Research 6 1996. **Nr. 10**: p. S. 986-994.

75. Warton, K., et al., *A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells*. Gene, 2004. **342**(1): p. 85-95.
76. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(9): p. e45-e45.
77. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. Journal of Biotechnology, 1999. **75**(2-3): p. 291-295.
78. Smith PK, K.R., Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC., *Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid*. Analytical Biochemistry, 1987 May 15: p. 76-85.
79. Claus, R.A., et al., *Synthesis and antiapoptotic activity of a novel analogue of the neutral sphingomyelinase inhibitor scyphostatin*. Chembiochem, 2005. **6**(4): p. 726-37.
80. Förster, F., A. Volz, and G. Fricker, *Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(1): p. 396-403.
81. Khan, K.H., *Gene expression in Mammalian cells and its applications*. Adv Pharm Bull, 2013. **3**(2): p. 257-63.
82. Kozak, M., *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(20): p. 8125-48.
83. Pickering, B.M. and A.E. Willis, *The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(1): p. 39-47.
84. Mazumder, B., V. Seshadri, and P.L. Fox, *Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(2): p. 91-8.
85. Rinkenauer, A.C., et al., *A paradigm change: efficient transfection of human leukemia cells by stimuli-responsive multicompartiment micelles*. ACS Nano, 2013. **7**(11): p. 9621-31.
86. Spencer, M.L., M. Theodosiou, and D.J. Noonan, *NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(35): p. 37069-37078.
87. Engelsberg, A., et al., *The Golgi protein RCAS1 controls cell surface expression of tumor-associated O-linked glycan antigens*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22998-3007.
88. Reimer, T.A., et al., *Reevaluation of the 22-1-1 antibody and its putative antigen, EBAG9/RCAS1, as a tumor marker*. BMC Cancer, 2005. **5**.
89. Moseley, R.H., *Sepsis-associated cholestasis*. Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 302-306.
90. Bolder, U., et al., *Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion*. Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 214-25.
91. Anwer, M.S., *Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis*. Hepatology, 2004. **39**(3): p. 581-90.
92. Guillouzo, A., et al., *The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics*. Chem Biol Interact, 2007. **168**(1): p. 66-73.

93. Kanebratt, K.P. and T.B. Andersson, *Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies*. Drug Metabolism and Disposition, 2008. **36**(7): p. 1444-1452.
94. Hendriks, D.F., et al., *Hepatic 3D spheroid models for the detection and study of compounds with cholestatic liability*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35434.
95. Cerec, V., et al., *Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor*. Hepatology, 2007. **45**(4): p. 957-67.
96. Hoekstra, R., et al., *The HepaRG cell line is suitable for bioartificial liver application*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(10): p. 1483-9.
97. Weltin, A., et al., *Accessing 3D microtissue metabolism: Lactate and oxygen monitoring in hepatocyte spheroids*. Biosens Bioelectron, 2016. **87**: p. 941-948.
98. Lin, R.Z. and H.Y. Chang, *Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research*. Biotechnol J, 2008. **3**(9-10): p. 1172-84.
99. Curcio, E., et al., *Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system*. Biomaterials, 2007. **28**(36): p. 5487-97.
100. Edmondson, R., et al., *Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors*. Assay and Drug Development Technologies, 2014. **12**(4): p. 207-218.
101. Stapelbroek, J.M., et al., *Liver disease associated with canalicular transport defects: current and future therapies*. J Hepatol, 2010. **52**(2): p. 258-71.
102. Kortgen, A., P. Recknagel, and M. Bauer, *How to assess liver function?* Current Opinion in Critical Care, 2010. **16**(2): p. 136-141.
103. Dixon, L.J., et al., *Kupffer Cells in the Liver*. Comprehensive Physiology, 2013. **3**(2): p. 785-797.
104. Sekine, S., et al., *Interaction of Mrp2 with radixin causes reversible canalicular Mrp2 localization induced by intracellular redox status*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(11): p. 1427-34.
105. Nguyen, H.B., et al., *Early lactate clearance is associated with biomarkers of inflammation, coagulation, apoptosis, organ dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock*. Journal of Inflammation-London, 2010. **7**.
106. Diao, L., et al., *Regulation of MRP2/ABCC2 and BSEP/ABCB11 expression in sandwich cultured human and rat hepatocytes exposed to inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$* . J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31185-92.
107. Stross, C., et al., *Expression and localization of atypical PKC-Isoforms in liver parenchymal cells*. Biol Chem, 2009. **390**(3): p. 235-44.
108. Satoh, A., et al., *PKC-delta and -epsilon regulate NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and TNF-alpha in pancreatic acinar cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(3): p. G582-91.
109. Chang, Q. and B.L. Tepperman, *The role of protein kinase C isozymes in TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity to a rat intestinal epithelial cell line*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2001. **280**(4): p. G572-G583.
110. Yoo, J., et al., *Bryostatin-1 attenuates TNF-induced epithelial barrier dysfunction= role of novel PKC isozymes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(4): p. G703-12.

111. Tepperman, B.L., Q. Chang, and B.D. Soper, *Protein kinase C mediates lipopolysaccharide- and phorbol-induced nitric-oxide synthase activity and cellular injury in the rat colon*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(3): p. 1249-57.
112. Castagna, M., et al., *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters*. J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7847-51.
113. Kubitz, R., et al., *Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10323-30.
114. Corasanti, J.G., et al., *Protein kinase C agonists inhibit bile secretion independently of effects on the microcirculation in the isolated perfused rat liver*. Hepatology, 1989. **10**(1): p. 8-13.
115. Kubitz, R., et al., *Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells*. Hepatology, 2001. **34**(2): p. 340-50.
116. Assert, R., H. Schatz, and A. Pfeiffer, *Upregulation of PKC delta- and downregulation of PKC alpha-mRNA and protein by phorbol ester in human T84 cells*. FEBS Lett, 1996. **388**(2-3): p. 195-9.
117. Mutter, R. and M. Wills, *Chemistry and clinical biology of the bryostatins*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2000. **8**(8): p. 1841-1860.
118. Szallasi, Z., et al., *Differential regulation of protein kinase C isozymes by bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate in NIH 3T3 fibroblasts*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2118-24.
119. Stanwell, C., et al., *The role of protein kinase C isoenzymes in the growth inhibition caused by bryostatin 1 in human A549 lung and MCF-7 breast carcinoma cells*. Int J Cancer, 1994. **56**(4): p. 585-92.
120. Cattaneo, F., G. Guerra, and R. Ammendola, *Expression and signaling of formyl-peptide receptors in the brain*. Neurochem Res, 2010. **35**(12): p. 2018-26.
121. Camps, M., et al., *Blockade of PI3K gamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis*. Nature Medicine, 2005. **11**(9): p. 936-943.
122. Doggrell, S.A., *Phosphoinositide 3-kinase-gamma as a target in rheumatoid arthritis and systemic lupus*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2006. **10**(4): p. 627-630.
123. Toullec, D., et al., *The Bisindolylmaleimide Gf-109203x Is a Potent and Selective Inhibitor of Protein-Kinase-C*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(24): p. 15771-15781.
124. Jacobson, P.B., et al., *Anti-inflammatory properties of Go 6850: a selective inhibitor of protein kinase C*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **275**(2): p. 995-1002.
125. Martiny-Baron, G., et al., *Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976*. J Biol Chem, 1993. **268**(13): p. 9194-7.
126. Fabbro, D., et al., *PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential*. Anticancer Drug Des, 2000. **15**(1): p. 17-28.
127. Stone, R.M., et al., *Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412*. Blood, 2005. **105**(1): p. 54-60.

## 7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben : apl. Prof. Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Claus beim Studiendesign, der Auswahl der Methoden sowie bei der Ergebnissinterpretation und -darstellung, Dr. rer. nat. Adrian Press bei der Durchführung und inhaltlichen Auswertung der immunhistochemischen Experimente,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 19.12.2016

Gustav Buescher

## 8 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Ralf Claus, dessen Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit geduldig und inspirierend war. Er stand mir mit stets hilfreichen Ratschlägen zur Seite und scheute sich nicht davor mich auch im Kittel praktisch anzuleiten und zu unterstützen. Beachtlich war die von ihm für interessante Diskussionen und zielführende Beratung aufgewendete Zeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Adrian Press, der es vermochte mich technisch versiert und zielorientiert bei den aufkommenden Fragen im Labor zu unterstützen.

Weiter möchte ich mich auch bei den Kolleginnen und Kollegen, den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern und medizintechnischen Assistentinnen und Assistenten des Fachbereichs Experimentelle Anästhesie der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin für die Geduld, die mir bei der Einführung in neue Methoden entgegengebracht wurde und die humorvolle Gestaltung des Laboraltags bedanken.

Meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie die Geduld aufbrachten mich in diesem Lebensabschnitt immerwährend zu unterstützen, sei es in arbeits- und stressreichen Phasen oder solchen, in denen Ablenkung nötig war.

Dankbar bin ich Dominic Bertram, Vincent Maertins und Henrike Wilckens, die sich die Zeit nahmen die Arbeit Korrektur zu lesen.

Diese Arbeit wäre nicht entstanden ohne die Motivation und Hilfe meiner Mutter Michaela Buescher, meines Vaters Uwe Drepper und meines Bruders Oskar Buescher.

## 9 Lebenslauf

# Anhang

DEFINITION Homo sapiens radixin (RDX), transcript variant 3, mRNA.

FASTA >NM\_002906 4498 bp

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\_002906.3

>gi|62244047|ref|NM\_002906.3| Homo sapiens radixin (RDX), transcript variant 3, mRNA

```

TTGGCGCTCAGTCCGCGGCGCGAGGACGGCCGGCGGCGAGGGGAGGCGGGGGGCGCCGGGCAGCCCCG
CCTTTTCCCGCGGAGCGGCCGAGCGGCCATATTGCGGAGCTGTCTGCGGTGGCGGCGGCGCCTCTCGTCT
CCCGCGGCCAGCGCTCGCACCACCGCTTCTCCCTCCCTGTGCGAGCGCGCGCGCGCAGCGCCCCAG
CCACACGCCGCGCGGCGAGGAGCGGCCGCTCTCCGGAAGTGATAACAGAATTCATTGAAGTGGAGAATT
TTTAAAGAAGGTAACAAAAGAGAAAGAAATGCGGAACCAATCAACGTAAGAGTAACACAAATGGATG
CTGAGCTGGAAATTTGCCATTGACCCCAATACAACTGGCAAACAACATTTTGACCAAGTGGTGAACACAGT
TGGTTTGGCGTGAGGCTCGTTTGGGCTGCAGTATGTAGACAGCAAGGTTATTCTACATGGCTTAAA
CTAAATAAAAGGTAACACAGCAGGATGTTAAAAAGAGAATCCTTTACAGTTCAAGTTTAGAGCTAAAT
TCITTCCTGAAGATGTTTCTGAGGAATTAATCAAGAAATAACCCAGAGACTCTCTCTTGGCAAGTTAA
AGAAGCCATCTTAAATGATGAGATATATTGCCCGCCAGAACTGCAAGTTCTTTGGCTTCCATGTCTGTC
CAAGCCAAGTATGGAGATTACAATAAGAGATTCAAGCCAGGCTACCTGGCTAATGATAGACTCCTAC
CCCAGCGTGTATTGGAACACACAACTAACAAAGAACAGTGGGAAGAAAGAAATACAGAACTGGCATGA
AGAACATAGAGGAATGTTAAGGAGGATTCTATGATGGAATACCTGAAGATTGCACAAGATCTAGAAATG
TATGGAGTCAACTATTTTGAATAAAAAATAAAAAAGGAAGTGAATTTGGCTAGGTGTTGATGCTTTGG
GTCTGAATATTTATGAGCATGACGACAAGTTAACACCTAAAATTTGGTTTCCCTGGAGTGAATCAGAAA
TATTTCAATTAATGACAAAAAATTTGTTATAAGCCAAATCGCAAAAAGGCACCTGATTTTGTGTTTAT
GCACCTCGTCTGAGAAATCAATAAGCGGATTTTGGCCTTATGTATGGAAACCATGAACATATACATGCGAA
GAAGGAACCTGATACATTAAGTACAAACAGATGAAGCTCAGGCTAGGAGGAGAAACATCAGAAGCA
GTTGGAAGGGCAACAATTAGAGAATGAAAGAAGAAAAAGAGAAATAGCAGAAAAGGAAAGGAAAGAAATA
GAACGTGAAAGGAAGAGCTAATGGAACGCTTAAACAAATTTGAAGAGCAGACAATTAAGGCTCAGAAAG
AACTAGAGAAGACAGACTCGAAAAGCTCTAGAATCGATCAAGAACGAAACGAGCAAAAAGGAAGCAGA
ACGACTTGAAGAGGAGCGTGCAGCTGCTGAAGAGGCAAGCTCTGCCATAGCAAAACAAGCTGCCGCCAG
ATGAGAATCAGGAGCAGCTAGCAGCAGAACTTGCTGAATTAAGTCCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAG
CCAAAGAAAGAAAGGAAGGAGGAGCTACTGAGTGGCAACACAAGCTTTTGCAGCCAGGAAGACTTGGAA
AAAGACCAAGGAAGAGTTAAAACTGCTGATGCTGCCCCCTCCACCTCCACCCACCACAGCTCATTCTCT
CCAACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGCTGAAGCTAGTGTGAATATCAATGAAG
GGGTAATGAACCATAGAAAGCAGGAGGAGGAGTGAACCGAAACACAGAAAAATGAGCGTGTAAAGAGCA
ACTTCAGGCATTAAAGTTGAGAATTAAGCCAAAGCAGAGATGAACCAAGAAACACAAAAATGATGTTCTT
CATGCTGAGAATGTAAAGCAGGCCGCTGATAAGTACAAGACTCTGCGACAGATTGCAACAAGGCAATACAA
AGCAGCGTATCGATGAGTTTGAAGCAATGAGAGCTGTTATTTGCATATATGTTCTTCATAGCTGAA
CCACCAACAGAGAAAGAGCGCCCTTTGCAGATATGATGGAATGCATCCACCTTGCCAAAGCACTTACAC
CAGTTTGAAGTGTCTAGCTAGTAAAGACAAATTAAGGGGAGCTCTTCAACATTAAAGCAGTATGATATCAT
GCTTGGTTTCTTTCTTTTCTTTTGGTCCAGGGAATGGAGAATGGTGTCTCCATTGCCCTCTTTTCACTTTT
TTCTTTTCTTTTCTTTTCTGTTGAAGATTAACTAATTTATCAGCTCTGACAAATGTGTATGTGTGG
TTTCAGTTCTGTGTACATTTTAAAGGATAATGGTGAACATTTTAAAGGTTTCCCTTGCCCTTTCCATAT
TTAACTATTTCCACATTTCTCTCTCACTCACATTTTCTCAGTGTGCCCTTCTCTATCTGCCATGTCCAT
AGCCATAATTCACCATCATACAGATCAGGCAGTGTTTAAATGATGGTAGGACAGTGGACAGTCT
TTGATCATCATGTAGAAATATGGCTATGAATCAGGAAGAGATTAGAACATTTAATAATGTATGTACAGCT
GGTGTAGTATTTTAAATCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
AGTCATCTTTAAACAGCTTACACTGATTGGTGTTTATCTCCTGTGATCCTTTGATGGCTTTTTTGCCTA
CCATTTACAGAGGTTTGAAGCAGCTAGTAGCTCCCTAGGAGAGTTTACTGATGAACAGCCTCTGCAG
GATTTTAAAGTTTGTCTCTTTATAGACTGATTGAGAAAAACAAATGATTAGTAAAAAAGAAAAATAT
ACATTTGTTGGTAACATATGTTATTTTAAACCTGGACCTTTTCTGGAAGGGCAGCATATAAAACAT
CAGTCCCAGAGGAGGAGCAACAATACTACCTCACTACTACATCTGTGATGACTGGTGTGTTCAACACAAAT
GGAGTGTGTAGAGTATATGTTTATAATTCATAACCATAGCCTCGATCATCAAGAAATACTTTTCGAAAT
TCATTTTCTCTAGAAATCTTAAAGAGTGTAAATTTTAACTGCCTTTTGTGAGTCAAACTGTGGGA
TTCTGATTGTATTAATAATTTGAAGCTCCTCACTGGTATACATCATCCTGGAGGGGTGTTGATGGCTG
AGCAAGAGAGAGAGAATGAGAGAGAGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTATGAGAGAGAGAAATGCTAACCTGTAGCATGTGAAGAATGTCTGTACCTTGATACGATAGTTACA
TAATCAGTATATTTGGTTTCTAGATCACTGTGCTTATTTGTTCAATCTCTGACTAAAAATACCTTAAAT
TTGGTTTGTAAATCTTATTTTGAATAATATATTTAGTTTATATTAATTTTCGGTTATAGCTTACTGAA
GAAATCTTCCAGTTAGAAGGAGGTTCTAATATTCACATGTTCTAATACCTTTGTTTATTGTAAACAGCT
AAATTTGAGATACGTTAAAGCCTTGTCTCTGTGTGGTTTCACTACTTTCCATTGGTATTACACAGT
CAATTTTACATTTTCTATTAATAATTTGCAATTTTATTAACATTTTCAAGCAGTAGATTCAAGTTGTG
TCTGAAATATCTCTGTGCTTTTGTGATTTGCTGACTTTAAAGGATTAATCTGGGCAGACATATGTT
AAAGAAAGGTTGCGTTTAAATATATTTTGAACCTTTGTAGGACAAAACATAGCTGGTTAACCTTGAAGT
GACTGTTGTACCATGGTTGTGCACATGCTTCAGAACTTGAAGAGAAATTTCTACTTGCAGTACAT
CAAGGAATGGATGGTGGACCTTACTATTGATGTTTGGAGACATAAATGTTCACTTTAAAGCAATGGCAT
AATAGATAAAACCTGAACCTTCAATTGGATTTTGTAAATTTTCCCTCATTTTGAATTTATGTGCACTACCA
TAGCTACATCAGTTTATACAGTATTGAAAAATATCAGTTATATTTGCTGTTTATGATCTATTTGTAG
ATTAGGATTAATGGATTAAATCCATTTTAAAGGCTGTGTGAATTTTCTAAACAAGAACCAATTTGCAA
TATGGATTTCTTAGAGATTAAACCAATTAATCTTATAGCAGTCGCGAGCAGCATGTTCTATATAGTCAAT
GTAAATACACTAATGAGTATTTGGTAAATCCAGTAGGCTTTTACCATTAGCATAATTTTGTGTTGTA
CAATTAAGTTACAATTACATCTCAATTTTGGATAATATTCATTGGTTAAACAATAAGTGACAAAAGCTC
ATGCTTC

```

FASTA Darstellung der Transkript Variante 3, NM\_002906 human Radixin



# 10 Anhang

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment human Radixin no UTRs <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> ATG Startcodon ; TGA/TAA Stopcodon

variant1	ATCCGGAACCAATCAACGTAAAGCTAATCAATATGGATGCTGAGCTGGAAATTTGCCATT	variant1	TCAGAAGCAGTTGGAAAGGCGCAATTAGAATAGAAAGCAAGAAAGAGAAATAGCAGA
variant2	ATCCGGAACCAATCAACGTAAAGCTAATCAATATGGATGCTGAGCTGGAAATTTGCCATT	variant2	TCAGAAGCAGTTGGAAAGGCGCAATTAGAATAGAAAGCAAGAAAGAGAAATAGCAGA
variant3	ATCCGGAACCAATCAACGTAAAGCTAATCAATATGGATGCTGAGCTGGAAATTTGCCATT	variant3	TCAGAAGCAGTTGGAAAGGCGCAATTAGAATAGAAAGCAAGAAAGAGAAATAGCAGA
plasmid_version	ATCCGGAACCAATCAACGTAAAGCTAATCAATATGGATGCTGAGCTGGAAATTTGCCATT	plasmid_version	TCAGAAGCAGTTGGAAAGGCGCAATTAGAATAGAAAGCAAGAAAGAGAAATAGCAGA
variant4	-----	variant4	TCAGAAGCAGTTGGAAAGGCGCAATTAGAATAGAAAGCAAGAAAGAGAAATAGCAGA
variant5	-----	variant5	-----
variant6	ATCCGGAACCAATCAACGTAAAGCTAATCAATATGGATGCTGAGCTGGAAATTTGCCATT	variant6	-----
variant1	CAGGCCAATACAACTGGCAAAACACTTTTGGACAGGTGGTAAAAACAGTTGGTTTGGCT	variant1	AAAGGAAAAGGAAAGAAATAGAACGTGAAAAGGAAGAGCTAATGGAACGTCTAAAAACAAAT
variant2	CAGGCCAATACAACTGGCAAAACACTTTTGGACAGGTGGTAAAAACAGTTGGTTTGGCT	variant2	AAAGGAAAAGGAAAGAAATAGAACGTGAAAAGGAAGAGCTAATGGAACGTCTAAAAACAAAT
variant3	CAGGCCAATACAACTGGCAAAACACTTTTGGACAGGTGGTAAAAACAGTTGGTTTGGCT	variant3	AAAGGAAAAGGAAAGAAATAGAACGTGAAAAGGAAGAGCTAATGGAACGTCTAAAAACAAAT
plasmid_version	CAGGCCAATACAACTGGCAAAACACTTTTGGACAGGTGGTAAAAACAGTTGGTTTGGCT	plasmid_version	AAAGGAAAAGGAAAGAAATAGAACGTGAAAAGGAAGAGCTAATGGAACGTCTAAAAACAAAT
variant4	-----	variant4	AAAGGAAAAGGAAAGAAATAGAACGTGAAAAGGAAGAGCTAATGGAACGTCTAAAAACAAAT
variant5	-----	variant5	-----
variant6	CAGGCCAATACAACTGGCAAAACACTTTTGGACAGG-----	variant6	-----
variant1	GAGGCTCTGGTTTTTTGGGCTCGAGTATGTAGACAGCAAAAGTTTATCTACATGGCTTAAA	variant1	TGAAGAGCAGACAAATTAAGCTCAGAAAGAACTAGAAGAACAGACTCGAAAAGCTCTAGA
variant2	GAGGCTCTGGTTTTTTGGGCTCGAGTATGTAGACAGCAAAAGTTTATCTACATGGCTTAAA	variant2	TGAAGAGCAGACAAATTAAGCTCAGAAAGAACTAGAAGAACAGACTCGAAAAGCTCTAGA
variant3	GAGGCTCTGGTTTTTTGGGCTCGAGTATGTAGACAGCAAAAGTTTATCTACATGGCTTAAA	variant3	TGAAGAGCAGACAAATTAAGCTCAGAAAGAACTAGAAGAACAGACTCGAAAAGCTCTAGA
plasmid_version	GAGGCTCTGGTTTTTTGGGCTCGAGTATGTAGACAGCAAAAGTTTATCTACATGGCTTAAA	plasmid_version	TGAAGAGCAGACAAATTAAGCTCAGAAAGAACTAGAAGAACAGACTCGAAAAGCTCTAGA
variant4	-----	variant4	TGAAGAGCAGACAAATTAAGCTCAGAAAGAACTAGAAGAACAGACTCGAAAAGCTCTAGA
variant5	-----	variant5	TGAAGAGCAGACAAATTAAGCTCAGAAAGAACTAGAAGAACAGACTCGAAAAGCTCTAGA
variant6	-----	variant6	-----
variant1	CTAAATAAAAAGGTAAACACAGCAGGATGTTAAAAAGAGAATCCTTTACAGTTCAAGTTT	variant1	ACTGGATCAAGAAGCAAGAAACGAGCAAAAGAAAGAGCAGACGACTTGAAGAGGAGCGTCG
variant2	CTAAATAAAAAGGTAAACACAGCAGGATGTTAAAAAGAGAATCCTTTACAGTTCAAGTTT	variant2	ACTGGATCAAGAAGCAAGAAACGAGCAAAAGAAAGAGCAGACGACTTGAAGAGGAGCGTCG
variant3	CTAAATAAAAAGGTAAACACAGCAGGATGTTAAAAAGAGAATCCTTTACAGTTCAAGTTT	variant3	ACTGGATCAAGAAGCAAGAAACGAGCAAAAGAAAGAGCAGACGACTTGAAGAGGAGCGTCG
plasmid_version	CTAAATAAAAAGGTAAACACAGCAGGATGTTAAAAAGAGAATCCTTTACAGTTCAAGTTT	plasmid_version	ACTGGATCAAGAAGCAAGAAACGAGCAAAAGAAAGAGCAGACGACTTGAAGAGGAGCGTCG
variant4	-----	variant4	ACTGGATCAAGAAGCAAGAAACGAGCAAAAGAAAGAGCAGACGACTTGAAGAGGAGCGTCG
variant5	-----	variant5	ACTGGATCAAGAAGCAAGAAACGAGCAAAAGAAAGAGCAGACGACTTGAAGAGGAGCGTCG
variant6	-----	variant6	-----
variant1	AGAGCTAAATCTTCTTCTGAAGATGTTTCTGAGGAATTAATCAAGAAATAACCCAGAGA	variant1	AGCTGCTGAAGAGGCAAGTCTGCCATAGCAAAACAGCTGCCGACCATGGAAGATCA
variant2	AGAGCTAAATCTTCTTCTGAAGATGTTTCTGAGGAATTAATCAAGAAATAACCCAGAGA	variant2	AGCTGCTGAAGAGGCAAGTCTGCCATAGCAAAACAGCTGCCGACCATGGAAGATCA
variant3	AGAGCTAAATCTTCTTCTGAAGATGTTTCTGAGGAATTAATCAAGAAATAACCCAGAGA	variant3	AGCTGCTGAAGAGGCAAGTCTGCCATAGCAAAACAGCTGCCGACCATGGAAGATCA
plasmid_version	AGAGCTAAATCTTCTTCTGAAGATGTTTCTGAGGAATTAATCAAGAAATAACCCAGAGA	plasmid_version	AGCTGCTGAAGAGGCAAGTCTGCCATAGCAAAACAGCTGCCGACCATGGAAGATCA
variant4	-----	variant4	AGCTGCTGAAGAGGCAAGTCTGCCATAGCAAAACAGCTGCCGACCATGGAAGATCA
variant5	-----	variant5	AGCTGCTGAAGAGGCAAGTCTGCCATAGCAAAACAGCTGCCGACCATGGAAGATCA
variant6	AGAGCTAAATCTTCTTCTGAAGATGTTTCTGAGGAATTAATCAAGAAATAACCCAGAGA	variant6	AGCTGCTGAAGAGGCAAGTCTGCCATAGCAAAACAGCTGCCGACCATGGAAGATCA
variant1	CTCTTCTCTTCTGCAAGTTAAAGAAGCCATCTTAAATGATGAGATATATGCCCCGCGAGAA	variant1	GGAGCAGCTAGCAGCAAGACTTGCTGAATTCACCTGCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAGC
variant2	CTCTTCTCTTCTGCAAGTTAAAGAAGCCATCTTAAATGATGAGATATATGCCCCGCGAGAA	variant2	GGAGCAGCTAGCAGCAAGACTTGCTGAATTCACCTGCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAGC
variant3	CTCTTCTCTTCTGCAAGTTAAAGAAGCCATCTTAAATGATGAGATATATGCCCCGCGAGAA	variant3	GGAGCAGCTAGCAGCAAGACTTGCTGAATTCACCTGCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAGC
plasmid_version	CTCTTCTCTTCTGCAAGTTAAAGAAGCCATCTTAAATGATGAGATATATGCCCCGCGAGAA	plasmid_version	GGAGCAGCTAGCAGCAAGACTTGCTGAATTCACCTGCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAGC
variant4	-----	variant4	GGAGCAGCTAGCAGCAAGACTTGCTGAATTCACCTGCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAGC
variant5	-----	variant5	GGAGCAGCTAGCAGCAAGACTTGCTGAATTCACCTGCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAGC
variant6	CTCTTCTCTTCTGCAAGTTAAAGAAGCCATCTTAAATGATGAGATATATGCCCCGCGAGAA	variant6	GGAGCAGCTAGCAGCAAGACTTGCTGAATTCACCTGCCAAGATTGCACTTCTAGAGGAAGC
variant1	ACTGCAGTTCTTTTGGCTTCTATGCTGTCGAAGCCAAAGTATGGAGATTACAATAAAGAG	variant1	CAAGAAGAAAAGGAAAGAGGAGTACTGAGTGGCAACACAAAGCTTTTGACGCCGAGGA
variant2	ACTGCAGTTCTTTTGGCTTCTATGCTGTCGAAGCCAAAGTATGGAGATTACAATAAAGAG	variant2	CAAGAAGAAAAGGAAAGAGGAGTACTGAGTGGCAACACAAAGCTTTTGACGCCGAGGA
variant3	ACTGCAGTTCTTTTGGCTTCTATGCTGTCGAAGCCAAAGTATGGAGATTACAATAAAGAG	variant3	CAAGAAGAAAAGGAAAGAGGAGTACTGAGTGGCAACACAAAGCTTTTGACGCCGAGGA
plasmid_version	ACTGCAGTTCTTTTGGCTTCTATGCTGTCGAAGCCAAAGTATGGAGATTACAATAAAGAG	plasmid_version	CAAGAAGAAAAGGAAAGAGGAGTACTGAGTGGCAACACAAAGCTTTTGACGCCGAGGA
variant4	-----	variant4	CAAGAAGAAAAGGAAAGAGGAGTACTGAGTGGCAACACAAAGCTTTTGACGCCGAGGA
variant5	-----	variant5	-----
variant6	ACTGCAGTTCTTTTGGCTTCTATGCTGTCGAAGCCAAAGTATGGAGATTACAATAAAGAG	variant6	-----
variant1	ATTATATAGCCAGGCTACTGGCTAATGATAGACTCTACCCACAGCGTGATTTGGAACAA	variant1	AGACTTGGAAAAGGACCAAGAGAGTATAAACTGTGATGCTGCCCCCCCCCTCCACTCC
variant2	ATTATATAGCCAGGCTACTGGCTAATGATAGACTCTACCCACAGCGTGATTTGGAACAA	variant2	AGACTTGGAAAAGGACCAAGAGAGTATAAACTGTGATGCTGCCCCCCCCCTCCACTCC
variant3	ATTATATAGCCAGGCTACTGGCTAATGATAGACTCTACCCACAGCGTGATTTGGAACAA	variant3	AGACTTGGAAAAGGACCAAGAGAGTATAAACTGTGATGCTGCCCCCCCCCTCCACTCC
plasmid_version	ATTATATAGCCAGGCTACTGGCTAATGATAGACTCTACCCACAGCGTGATTTGGAACAA	plasmid_version	AGACTTGGAAAAGGACCAAGAGAGTATAAACTGTGATGCTGCCCCCCCCCTCCACTCC
variant4	-----	variant4	AGACTTGGAAAAGGACCAAGAGAGTATAAACTGTGATGCTGCCCCCCCCCTCCACTCC
variant5	-----	variant5	AGACTTGGAAAAGGACCAAGAGAGTATAAACTGTGATGCTGCCCCCCCCCTCCACTCC
variant6	ATTATATAGCCAGGCTACTGGCTAATGATAGACTCTACCCACAGCGTGATTTGGAACAA	variant6	AGACTTGGAAAAGGACCAAGAGAGTATAAACTGTGATGCTGCCCCCCCCCTCCACTCC
variant1	CACAACTAACAAAAGAACAGTGGGAAGAA--AGAATACAGAACTGGCATGAAGAACATAG	variant1	ACCACCACCAGTCATTCTCCACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGC
variant2	CACAACTAACAAAAGAACAGTGGGAAGAA--AGAATACAGAACTGGCATGAAGAACATAG	variant2	ACCACCACCAGTCATTCTCCACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGC
variant3	CACAACTAACAAAAGAACAGTGGGAAGAA--AGAATACAGAACTGGCATGAAGAACATAG	variant3	ACCACCACCAGTCATTCTCCACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGC
plasmid_version	CACAACTAACAAAAGAACAGTGGGAAGAA--AGAATACAGAACTGGCATGAAGAACATAG	plasmid_version	ACCACCACCAGTCATTCTCCACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGC
variant4	CACAACTAACAAAAGAACAGTGGGAAGAA--AGAATACAGAACTGGCATGAAGAACATAG	variant4	ACCACCACCAGTCATTCTCCACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGC
variant5	CACAACTAACAAAAGAACAGTGGGAAGAA--AGAATACAGAACTGGCATGAAGAACATAG	variant5	ACCACCACCAGTCATTCTCCACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGC
variant6	CACAACTAACAAAAGAACAGTGGGAAGAA--AGAATACAGAACTGGCATGAAGAACATAG	variant6	ACCACCACCAGTCATTCTCCACAGAAAACGAACATGATGAACACGATGAGAATAATGC
variant1	AG-----GAATGTAAAGGAGGATTCTATGATGGAATACCTGAAGATTGCACAAGATCTAG	variant1	TGAAGCTAGTGTGTAATTAATAAGTGAAGGGTAAATGAACCATAGAAGCGAGGAAGAAC
variant2	AG-----GAATGTAAAGGAGGATTCTATGATGGAATACCTGAAGATTGCACAAGATCTAG	variant2	TGAAGCTAGTGTGTAATTAATAAGTGAAGGGTAAATGAACCATAGAAGCGAGGAAGAAC
variant3	AG-----GAATGTAAAGGAGGATTCTATGATGGAATACCTGAAGATTGCACAAGATCTAG	variant3	TGAAGCTAGTGTGTAATTAATAAGTGAAGGGTAAATGAACCATAGAAGCGAGGAAGAAC
plasmid_version	AG-----GAATGTAAAGGAGGATTCTATGATGGAATACCTGAAGATTGCACAAGATCTAG	plasmid_version	TGAAGCTAGTGTGTAATTAATAAGTGAAGGGTAAATGAACCATAGAAGCGAGGAAGAAC
variant4	AG-----GAATGTAAAGGAGGATTCTATGATGGAATACCTGAAGATTGCACAAGATCTAG	variant4	TGAAGCTAGTGTGTAATTAATAAGTGAAGGGTAAATGAACCATAGAAGCGAGGAAGAAC
variant5	AG-----GAATGTAAAGGAGGATTCTATGATGGAATACCTGAAGATTGCACAAGATCTAG	variant5	TGAAGCTAGTGTGTAATTAATAAGTGAAGGGTAAATGAACCATAGAAGCGAGGAAGAAC
variant6	TGCTGAGAATGTTAAAGCAGG-----CCGTGATTAAGTACAAGACTCTG	variant6	-----
variant1	AAATGTATGGAGTCAACTATTTTGAATAAAAAATAAAAAAGAAC-----TGAATGTGGC	variant1	TGTAACCGAAACACAGAAAAATGAGCGTGTTAAGAAGCACTTCAGGCATTAAAGTTCAGA
variant2	AAATGTATGGAGTCAACTATTTTGAATAAAAAATAAAAAAGAAC-----TGAATGTGGC	variant2	TGTAACCGAAACACAGAAAAATGAGCGTGTTAAGAAGCACTTCAGGCATTAAAGTTCAGA
variant3	AAATGTATGGAGTCAACTATTTTGAATAAAAAATAAAAAAGAAC-----TGAATGTGGC	variant3	TGTAACCGAAACACAGAAAAATGAGCGTGTTAAGAAGCACTTCAGGCATTAAAGTTCAGA
plasmid_version	AAATGTATGGAGTCAACTATTTTGAATAAAAAATAAAAAAGAAC-----TGAATGTGGC	plasmid_version	TGTAACCGAAACACAGAAAAATGAGCGTGTTAAGAAGCACTTCAGGCATTAAAGTTCAGA
variant4	AAATGTATGGAGTCAACTATTTTGAATAAAAAATAAAAAAGAAC-----TGAATGTGGC	variant4	TGTAACCGAAACACAGAAAAATGAGCGTGTTAAGAAGCACTTCAGGCATTAAAGTTCAGA
variant5	CGAC-----AGATTGCAAGAGCA-----ATACAAA-----CGAGCGTATCGATGAGTTGAAGC	variant5	-----
variant6	-----	variant6	-----
variant1	TAGTGTGTGA-----TGCCTTGGGCTGAATTTTATGAGCATGACGACAAGTT	variant1	ATTAGCCCAAGCCAGAGATGAACCAAGAAAACACAAAATGATGTTCTTCACTGCTGAGAA
variant2	TAGTGTGTGA-----TGCCTTGGGCTGAATTTTATGAGCATGACGACAAGTT	variant2	ATTAGCCCAAGCCAGAGATGAACCAAGAAAACACAAAATGATGTTCTTCACTGCTGAGAA
variant3	TAGTGTGTGA-----TGCCTTGGGCTGAATTTTATGAGCATGACGACAAGTT	variant3	ATTAGCCCAAGCCAGAGATGAACCAAGAAAACACAAAATGATGTTCTTCACTGCTGAGAA
plasmid_version	TAGTGTGTGA-----TGCCTTGGGCTGAATTTTATGAGCATGACGACAAGTT	plasmid_version	ATTAGCCCAAGCCAGAGATGAACCAAGAAAACACAAAATGATGTTCTTCACTGCTGAGAA
variant4	TAGTGTGTGA-----TGCCTTGGGCTGAATTTTATGAGCATGACGACAAGTT	variant4	ATTAGCCCAAGCCAGAGATGAACCAAGAAAACACAAAATGATGTTCTTCACTGCTGAGAA
variant5	-----	variant5	ATTAGCCCAAGCCAGAGATGAACCAAGAAAACACAAAATGATGTTCTTCACTGCTGAGAA
variant6	AATGTGGGGACCCAACTGTATGCAATTTGTCAGATG-----CGCTCTGCAAGAG-----	variant6	-----
variant1	AACACCTAAAAATTTGGTTTTTCCCTGGAGTAAATCAGAAATATTTCAATTAATGACAAAAA	variant1	TGTTAAAGCAGGCCGTGATAAGTACAAGACTCTGCGACAGATTGCAAGCAAGCAATACAAA
variant2	AACACCTAAAAATTTGGTTTTTCCCTGGAGTAAATCAGAAATATTTCAATTAATGACAAAAA	variant2	TGTTAAAGCAGGCCGTGATAAGTACAAGACTCTGCGACAGATTGCAAGCAAGCAATACAAA
variant3	AACACCTAAAAATTTGGTTTTTCCCTGGAGTAAATCAGAAATATTTCAATTAATGACAAAAA	variant3	TGTTAAAGCAGGCCGTGATAAGTACAAGACTCTGCGACAGATTGCAAGCAAGCAATACAAA
plasmid_version	AACACCTAAAAATTTGGTTTTTCCCTGGAGTAAATCAGAAATATTTCAATTAATGACAAAAA	plasmid_version	TGTTAAAGCAGGCCGTGATAAGTACAAGACTCTGCGACAGATTGCAAGCAAGCAATACAAA
variant4	AACACCTAAAAATTTGGTTTTTCCCTGGAGTAAATCAGAAATATTTCAATTAATGACAAAAA	variant4	TGTTAAAGCAGGCCGTGATAAGTACAAGACTCTGCGACAGATTGCAAGCAAGCAATACAAA
variant5	-----	variant5	-----
variant6	-----	variant6	-----
variant1	ATTGTTTATAAAGCCAAATCGACAAAAGGCACTGATTTTGTGTTTTATGCACTTCGCTCT	variant1	CGAGCGTATCGATGAGTTTGAAGCAATGTGGGGACCCAACTGTATGCAATTTGTTCCAGAT
variant2	ATTGTTTATAAAGCCAAATCGACAAAAGGCACTGATTTTGTGTTTTATGCACTTCGCTCT	variant2	CGAGCGTATCGATGAGTTTGAAGCAATGTGGGGACCCAACTGTATGCAATTTGTTCCAGAT
variant3	ATTGTTTATAAAGCCAAATCGACAAAAGGCACTGATTTTGTGTTTTATGCACTTCGCTCT	variant3	CGAGCGTATCGATGAGTTTGAAGCAATGTGGGGACCCAACTGTATGCAATTTGTTCCAGAT
plasmid_version	ATTGTTTATAAAGCCAAATCGACAAAAGGCACTGATTTTGTGTTTTATGCACTTCGCTCT	plasmid_version	CGAGCGTATCGATGAGTTTGAAGCAATGTGGGGACCCAACTGTATGCAATTTGTTCCAGAT
variant4	ATTGTTTATAAAGCCAAATCGACAAAAGGCACTGATTTTGTGTTTTATGCACTTCGCTCT	variant4	CGAGCGTATCGATGAGTTTGAAGCAATGTGGGGACCCAACTGTATGCAATTTGTTCCAGAT
variant5	-----	variant5	-----
variant6	-----	variant6	-----
variant1	GAGAATCAATAAGCGGATTTTGGCTTATGTATGGGAAACCATGAACATACATGCGAAG	variant1	CGCGTCTTGGCAAGCAGCATAAAGCAATGTAA
variant2	GAGAATCAATAAGCGGATTTTGGCTTATGTATGGGAAACCATGAACATACATGCGAAG	variant2	CGCGTCTTGGCAAGCAGCATAAAGCAATGTAA
variant3	GAGAATCAATAAGCGGATTTTGGCTTATGTATGGGAAACCATGAACATACATGCGAAG	variant3	-----
plasmid_version	GAGAATCAATAAGCGGATTTTGGCTTATGTATGGGAAACCATGAACATACATGCGAAG	plasmid_version	-----
variant4	GAGAATCAATAAGCGGATTTTGGCTTATGTATGGGAAACCATGAACATACATGCGAAG	variant4	-----
variant5	-----	variant5	-----
variant6	-----	variant6	-----
variant1	AAGGAAGCCTGATACATTGAAGTACAAACAGATGAAGGCTCAGGCTAGGAGAGGAAACA	variant1	CGCGTCTTGGCAAGCAGCATAAAGCAATGTAA
variant2	AAGGAAGCCTGATACATTGAAGTACAAACAGATGAAGGCTCAGGCTAGGAGAGGAAACA	variant2	CGCGTCTTGGCAAGCAGCATAAAGCAATGTAA
variant3	AAGGAAGCCTGATACATTGAAGTACAAACAGATGAAGGCTCAGGCTAGGAGAGGAAACA	variant3	-----
plasmid_version	AAGGAAGCCTGATACATTGAAGTACAAACAGATGAAGGCTCAGGCTAGGAGAGGAAACA	plasmid_version	-----
variant4	AAGGAAGCCTGATACATTGAAGTACAAACAGATGAAGGCTCAGGCTAGGAGAGGAAACA	variant4	-----
variant5	-----	variant5	-----
variant6	-----	variant6	-----

Multiple Sequence Alignment human Radixin ohne UTR's

# 10 Anhang

>RG207953 The complete (insert plus vector) sequence of [RG207953] clone

LOCUS RG207953 8309 bp DNA circular SYN  
DEFINITION RDX (GFP-tagged) - Human radixin (RDX)  
ACCESSION NM\_002906  
VERSION NM\_002906.3  
SOURCE synthetic construct  
FEATURES Location/Qualifiers

misc_feature	201..924	CMV - Promoter
/label="CMV promoter"		
misc feature	839..856	
/label="Restriction Enzyme"		
misc feature	953..971	
/label="T7 promoter"		
misc_feature	2790..3494	Green Fluorescent Protein - Tag
/label="GFP"		
misc_feature	3541..4126	
/label="PolyA signal"		
misc feature	6218..6863	
/label="ColE1"		
misc feature	4580..5374	
/label="Neo"		
misc feature	4211..4513	
/label="SV40 ori"		
misc_feature	687..7738	Ampicillin Resistenz
/label="Amp"		
misc_feature	1020..1028	
/label="Restriction Enzyme"		
misc feature	2769..2775	
/label="Restriction Enzyme"		
misc_feature	1020..2769	Radixin Sequenz
/label="RDX"		
ATCGCC - Kozak		Kozak Sequenz

ORIGIN

1 AACAAATAT TAACGCTTAC AATTTCATT GCCTTCACG GCTGCGCAAC TGTGGGAAG	4681 TGCTCTGATG CCGCGGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGTTTCT TTTTGTCAAG
61 GCGGATCGGT GCGGGCGCTCT TCGTATTATC GCGCAGCTGG GAAAGGGGGA TGTGCTGCA	4741 ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAAGTG CAGGACGAGG CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG
121 GCGGATTAAG TTGGGTAAAC CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAA ACACGCGCA	4801 GCCACGACGG GCGTTCCTTG CCGCAGCTGTG CTCGACGTTG TCACGTGAAG GGGAAAGGAC
181 GTGCCAAGCT GATCTATACA TTGAATCAAT ATTGGCAATT AGCCATATTA GTCATTGGTT	4861 TGCTGCTATG TGGGCGAAGT GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACT TGCCTCTGCC
241 ATATAGCATA AATCAATATT GGCATTTGGC CATTCGATAC GTTGATCTA TATCATAATA	4921 GAGAAAGTAT CCATCATGGC TGATGCAATG CCGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC
301 TGTACATTAA TATTGGCTCA TGTCCAATAT GACCGGCATG TTGACATTA TTATTGACTA	4981 TGCCCAATCG ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CAGCTACTCG GATGGAAGCC
361 TGTATTAAAT GTAATCAATT AGTGGCTCAT TAGTTTCATG CCGATATATG GAGTTCCGGG	5041 GGTCTTGTGC ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG GGCTCGCGCC AGCCGAACGT
421 TTACATAACT TACGGTAAAT GCGCGGCTGT GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATTTG	5101 TTGCCGAGCG TCAAGGCGCG CATGCCGACG GCGCAGGATC TCGTCGTGAC CCATGGCGAT
481 CGTCAATAAT GACGTATGTT CCGATAGTAA GCGCAATAGG GACTTTCCAT TGACGTCAAT	5161 GCTGCTGTGC GGAATATCAT GTTGGAAAAA GGCCGCTTTT CTGGAATCAT CGACTGTGGC
541 GGGTGGAGTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGTAT CATATGCCAA	5221 CCGCTGGGTG TGCCCGACGC CTATCAGGAC ATAGCGTTTG CTACCGGTGA TATTGCTGAA
601 GTCCGCCCCC TATTGACGCT AATTGACGGTA AGTGGCCCGC CTGGCAATTAT GCCCAGTACA	5281 GAGCTTGGCG GCGAATGGGC TGACCGCTTC CTGCGCTTTT ACGGTATCGC CGCTCCCGAT
661 TGACCTTACG GACCTTTTCT ACTTGCGAGT ACATGTACGT ATTATACAT GCTATACACA	5341 TCGCAGCGCA TCGCTTTCTA TCGGCTTTCT TCTGAGCGGG ACTCTGGGGT
721 TGCGATCGCG GCGTTCACAG CCGCTGGATA GCGGTTTGAC TCGAGGATCG AGATTTCGAT	5401 TCGAATGAC CGACCAAGCG ACGCCCAATC TGCCATCACG AGATTTCGAT TCCACGCGCG
781 TTCCAAGTCT CACCCCAATT GACGTCATG GAGTTTGTG TTGGCACCAC AATCAACGGG	5461 CCTCTATGA AAGGTTGGG TTCCGAATCG TTTTCCGGGA CGCGGCTGG ATGATCCTTC
841 ACTTTCCTAA ACTTCGTAAT AACCCCGCCG CGTTCGACGA AATGGGCGTT AGGCTGTGAC	5521 AGCGCGGGGA TCTCATGCTG GAGTCTTTCG CCCCACCCAA CTTGTTTATT GCAGCTTATA
901 GTTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCGTT TAGTGAACCG TCGAATTTT GTAATACGAC	5581 ATGGTTTACA ATAAGCAAT AGCATCACAA ATTTTCACAA TAAAGCATTT TTTTCACTGC
961 TCACTATAGG CGCGCGGGGA ATTCTCGCAG TGGATTCGGT ACCGAGGAGA TCTGCCGCCG	5641 ATTTCTAGTG TGGTTTGTCC AAATCATCA ATGTATCTTA TCATGCTGTT ATACCGTGA
1021 CGATCGGCTC GCGCAACCA ATCAAGGTAA GAGTAACATC AATGGATGCT GAGCTGGAAT	5701 CCTCTAGCTA GAGCTTGGCG TAATCATGTT CATAGCTGTT TCGTGTGTGA AATTGTATTC
1081 TTGCAATTCA GCCCAATACA ACTGGGCAAC AACTTTTGA CCAGGTGGTG AAAACAGTTG	5761 CGCTCACAT TCCACACAA ATACAGGAGC GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGCTGCTC
1141 GTTTTGGTGA GGTCTGGTTT TTGGGCTGAG AGTATGTAGA CAGCAAGGT TATTCTACAT	5821 AATGAGTGAG CTAATCTACA TTAATTGGGT TGCGCTCAT GCGCGCTTTC CAGTCGGGAA
1201 GGCTTAAACT AAATAAAAG GTAACACAGC AGGATGTATA AAAAGAGAAT CTTTACAGT	5881 ACCTGTCGTG CCAGCTGCTA TAATGAATCG GCCAACCGCG GGGGAGAGGC GGTTTGGTGA
1261 TCAAGTTTAG AGCTAAATTC TTCTCTGAG ATGTTTCTGA GGAATTTAAT CAAGAAATAA	5941 TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TGCTGCTACT ACTCGCTGCG CCGCTCGTGT GGCTCGGGCC
1321 CCGCAGACTC CTTCTCTCTG CAAGTTAAGC AAGCACTCTT AAATGAGTAG ATATATTGCC	6001 GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGCGGTGTA TACGGTTATC CACAGAAATCA GGGGATAACG
1381 CGCCAGAAAC TGCAGTTCTT TTGGCTTCTT ATGCTGTCCA AGCCAAATGT GAGAGTATGC	6061 CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAGAGCCAGC AAAAGGCGAG GAACCTPAAA AAGCGCCGCT
1441 ATAAAGAGAT TCATAAGCCA GGCTACCTGG CTAATGATAG ACTCCTACCC CAGCGTGTAT	6121 TGCTGGCTTT TTTTCATAGC CTCGCCCCCC TCGAGCAGCA TCCAAAAAAT CAGCGCTCAA
1501 TGAAGACAACA CAAACTAACA AAGGAACAGT AATACAGAAC TGCATGAAG	6181 TCTCAGAGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAGATATCCA GCGATTTCCT CCGTGAAGCT
1561 AACATGAGAG AATGTTAAGG GAGGATTCTA TGAATGATA CTTGAAGATT GCAACAGATC	6241 CCTCTGTCGG CTCTCTGTTT CCGACCTGCG CGCTTACCGC ATACCTGTCC GCTTTCTCTC
1621 TAGAATGTGA TGGAGTCAAC TATTTTGA AAATAAATA AAAAGGAATC GAATGTGGC	6301 CTTGCGGGA GGTGGCGCTT TCTCATAGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTTGAGG
1681 TAGGTTGTGA TGTCTTGGGT CTGAATATTT ATGAGCATGA CAGCAAGTAA ACACATAAAA	6361 TGTGTTGCTC CAGCTTGGGC TGTGTGACG AACCCCGCTG TACAGCCGAC CGCTGGCGCT
1741 TTGGTTTCTC CTGGAGTGA ATCAAGATA TTTCATTAA TGCAAAZAA TTGTGTAAAT	6421 TATCCGTTAA CTATCTCTT GAGTCCAAAC CGGTAAAGCA CACTTATCG CCACTGGCAG
1801 AGCAATCTGA CAAAGAGCCA CCGTATTGTT TGTTTTATGC ACCTGTGCTG AAGCAATAA	6481 CAGCAGCTGG TAACAGATTT ACAGAGAGCA GGTATGTAG CCGTGCTACA GAGTTCTTGA
1861 AGAGATTTT GGCCTTATGT ATGGGAACCT ATGAATATA CATGCCAGA AGGAAGAGT	6541 ATGGTGGGCC TAACTAGGCG TACATAGAA GAACAGTATT TGTGATCTCT GCTCTGCTGA
1921 ATACTATTGA AGTACAACAG ATGAGGCTGT AGGTATGAGA GGAGAAACAT CAGAGACCTG	6601 AGCCAGTTAC TTTCCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CCGCAACAAA ACCACCGCTG
1981 TGAAGAGGCG ACAATTAGAG AATGAAAGC AGAAAGAGA AATAGCAGA AAGGAAAGG	6661 GTAGCGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA CTCAGCGCAG AAAAAGAGA TCTCAAGAG
2041 AAAGATAGAG ACGTGAAAGC AATGAGCTGA TGGAAAGTCT AAACAATTT GAGAGCAGA	6721 ACTTCTTGA TTTTCTTACG GGGCTGACG ATACAGTGAA CAAAACTCA CTTTAAGGGA
2101 CAATTAAAGC TCAGAAAGAA CTAGAGAGAC AGACTCGAAA AGCTCTAGAA CTGGATCAAG	6781 TTTTGGTCA GAGATTATCA AAAAGGATCT CAACTTAGAT CTTTATAAT TAAAAATGAA
2161 AAGCAAAAGC AGCAAAAGAA CTAGAGAGAC GATCTGAAA GGAGCGTCCA CTGTGTCAGG	6841 GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATAGT TAACCTTGGT TGACAGTTAC CAATGGTTAA
2221 AGGCAAGTCT TGCCATAGCA AAACAAGTGT CCGACAGATG GAGAAGATCAG GAGCAGATGA	6901 TCGTAGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCGTT ATCCATAGTT GCCTGACTCC
2281 CAGCAGAACT TGTGTAATTC AGTCGCAAGA TGCTGACTCT AGAGAAAGCC AAGAAGATAA	6961 CAGCTCGTGA GATAACTACG ATACGGGAGG GATTTACACT TGGCCCAAGT GCTCAATGA
2341 AGGAAGAGGA AGCTACTGAG TGGCAACACA AAGCTTTTGC AGCCCAAGGA ACCTTGGAAA	7021 TACGCGGAGA CCCAGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACAGC CACGCGGAGA
2401 AAGCCAAAGA AGAGTTAAAA ACTGTGATGT TCGCCCTCCC TCACCTCCA CACCCACAG	7081 GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CTTGCCACTT CATCCGACTC CATCCAGCTC ATTAATTGTT
2461 TCATTCCTCC AACAGAAAAC GAACATGATG AACAGATGA GAATTAATGCT GAAGCTAGTG	7141 GCGCGGAGCG TAGAGTAAGT AGTTCCGACG TTAATAGTTT GCGCAAGTTT TGTGCCATTG
2521 CTGAATTATC AATGTAAGGG GATCATGAAC TACTGACGGA GGAAGAACGT TTAACCCAACT	7201 CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCTG TGTGTATGGC TTGATTCAGC TCCGTTCTCC
2581 CACAGAAAAA TGAGCGGTGT AAGAGAACAT TCTCAGGCTT AAGTTCAGAA TTGATCCAGG	7261 AACATCTCAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTGTGGA AAGAGGGTTT AGCTCTCTCG
2641 CCGAGATGTA AACCAAGAAA ACACAAAATG ATGTTCTTCA TGCTGAGAA GTTAAGCAAG	7321 CTCTCCGAT CGTTGTGAGA AGTAAGTTGG CCGGAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGGAG
2701 GCGGTGATTA GTACAGAGCT CTGCGAGAGA TTGGACAGG CAATGCAAG CAGGATATCG	7381 CACTGCATAA TTCTTCTACT GTCACTGCAT CCGTAAGATG CTTTCTGTG ACTGGTAGT
2761 ATGAGTTTGA AGCAATGACG CTTACCGCGC CGCTCGAGAT GAGAGCGAG GAGAGCGGCG	7441 ACTCAACAAA GTATTTCTGA GATATCTGTA TCGCGCGAAC GAGTTGCTCT TCGCGGGCT
2821 TGCCGCCCAT GGAATATGCG TGTGGCTATG GAAAGCGCTG GATTCGAGC	7501 CATACCGGGA TAATACCGCG CCAATACGCG GACACTTAAA AGTGTGCTAT TGTGAGAGGA
2881 TGTGTGGCGC GCGAGAGGCG ACCCCGAGCG AGGGGCGCAT GAACCAAGA ATGAAGAGA	7561 GTTCTTCGGG GCGAAACCTC TCAAGATATT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATCTAAC
2941 CCAAAAGGCG CTTGACCTTC ATGCTGGAGT ACCAGCAAGG CTTCAAGAC CCGGATCGAG	7621 CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCACTAT CACAGAGGTT TCTGGGTGAG
3001 ACCACTTCTG CACTTACCCC AGCCGCTACG AGAACCCCTT CTTGCAACGC ATCAACAAAG	7681 CAAAACAGG AAGGCAAAAT CCGCGCAAAA GAGCAATAAG GCGCACAGG AAAEGTTGAA
3061 GCGGCTACAC CAACACCCCG CTATGAGAAG GAGTGAACCG CGCGTGTGCT CAGCTGAGCT	7741 TACTCATACT TCTCCTTTT CAATATTAT GAGCAATTA TACGGGTTAT TGTCTATTGA
3121 TCAGCTTACC CTACAGAGGCG GCGCGCGTGA TCGGCGACTT CAGGTTGATG GCCACCGGCT	7801 GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTC
3181 TCCCGGAGGA CAGCGGTGATC TTACACGACA AGATCATCCG CAGCAACGCT ACCGTGGAGT	7861 CCGGAAAGAT GCGACCTGAC GCGCGCTGTA GCGCGCATTA AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG
3241 ACCTGCAACC CATGGCGCAT AACGATCTGG ATGGCAGCTT CACCCGACCT TCGACGCTCG	7921 TTAGCGGAG CGTGACCGCT ACACCTGCCA GCGCGCTAGC GCGCGCTCTC TTGCTTTCTC
3301 GCGCAGCGCG CTACTACAGC TCCGTTGGTG ACAGCAACAT GCACTTCAAG ATGCGCAATCC	7981 TCCCTTCTCT TCTGCCACG TTCGCGGCTT TTCCCGCTCA AGCTCTAAAT CGGGGCGTCC
3361 ACCCCAGCAT CTCTGCAAGC GGGGGGCCCA TGTTCGCTTT CCGCGCGGTG GAGGAGGTAG	8041 CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGCG ACCTTCGACC CAAAATACT GATTAGGGTG
3421 ACAGCAACAC CAGAGCTGGG ATGCTGGAGT ACCAGCAAGG CTTCAAGAC CCGGATCGAG	8101 ATGGTTACAG TAGTGGGCCA TCGCCCTGAT AGACGGTATT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT
3481 ATGCGGTGTA AGAAGGTTT TAAACGGCGC GCGCGCGTCA TAGCTTTTTC CTGAACAGAT	8161 CACGTTCTTT TAATGATGGA CTCTTGTTC AACCTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG
3541 CCGGGTGGCG ATCCCTGTGA CCCCCTCCCA GTGCCCTCCC TGCCCTGGA AGTTGCCACT	8221 TCTATTCTTT TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTTCGG CTATTGGTTA AAAAATGAGC
3601 CCAATGCCCA CCGAGCTTGT CTTAATAAAA TTAAGTTGCA TCAATTTTGT TGACTGAGTG	8281 TGATTTAACA AAAATTTAAC GCGAATTTT
3661 TCTCTCTATA ATATTATGG GTTGGGGGGG GTGTATGGA GCAAGGGGGA AGTTGGGAGG	
3721 ACAACCTGTA GGGCGTGGG GGTCTATTGG GAACCAAGCT GGAGTGAGT GGCACAACT	
3781 TGCTCAGCTG CAATCTCCCG CTCCTGGGTT CACGAGATTC TCTGCTCTCA GCTCCGAGC	
3841 TTGTTGGGAT TCCAGGCAAT CCGTGAATTT TTTGTTTTTT TGGTATGAGA	
3901 CCGGGTTTCA CCAATATTGG CAGCTGTGTC TCCCACTCCT AATCTCAGT GATCTACCCA	
3961 CCTTGGCCTC CCAAAATGCT GGAATACAG CGGTGAACCA CTGCTCCCTT CCGCTGCTCT	
4021 CTGATTTTAA AATAACTATA CCGACGAGG GAGCTCCAGA CACAGCATAG GCTACCTGGC	
4081 CATGCCCAAC CGGTGGGACA TTTGAGTTGC TTGCTTGGCA CTGTCTCTC CTGCTTGGG	
4141 TCCACTCAGT AGATGCCGTG TGAATTTGGT ACGCGGCGAC CTGGCTGTG GAATGTGTGT	
4201 CAGTTAGGGT GTGGAAGATC CCGAGGCTCC CCGACGAGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT	
4261 CTCATTTAGT CAGCAACCAAG GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAG CAGAAGTATG	
4321 CAAAGCATGC ATCTCAATTA TCTCAGCAAC ATAGTCCCGC CCCTAAGCT GCCCATCCCG	
4381 CCCTAAGCT CCGCCAGTTC CGCCCATTTCT CCGGCCCATG GCTGACTAAT TTTTATTTAT	
4441 TATGCAGAGG CCGAGGCGCG CTGGCCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT	
4501 TTTGAGGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTCT CCGGGAGCTT GTATATCCAT TTTTGGATCT	
4561 GATCAAGAGA CAGGATGAGG ATGCTTTTGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAAGT	
4621 TCTCGCGCGC CTTGGGTGGA GAGGCTATT C GGTATGACT GGGCACAACA GACAATCGCG	

## FASTA Darstellung des verwendeten Radixin Plasmids

Kendall's tau-P	PKPCA		PKCCO		PKNC2		PKNC1		PKNC0	
	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert
WHL-P 0h	0.00327	0.1518	0.00465	0.1705	0.00436	0.1739	0.00458	0.1739	0.00436	0.1739
WHL-P 0h + GO 6850	-0.46791	0.8527	0.1052	0.3902	-0.83070	0.2406	-0.16179	0.2728	-0.16179	0.2728
WHL-P 0h + GO 6976	-0.28070	0.7040	0.00535	0.3586	-0.35827	0.0953	-0.25394	0.14197	-0.25394	0.14197
WHL-P 1h	-0.80967	0.0760	0.00000	0.28136	-0.42465	0.0862	-0.31958	0.2037	-0.31958	0.2037
WHL-P 1h + GO 6850	-0.64173	0.1138	0.00000	0.10081	-1.13091	0.1269	-0.93863	0.1446	-0.93863	0.1446
WHL-P 1h + GO 6976	-0.96044	0.2125	0.00000	0.28824	-1.05956	0.0847	-0.92218	0.1208	-0.92218	0.1208
PKA 0h	-0.45729	0.09575	0.00015	0.3586	-0.85913	0.0943	-0.25339	0.13382	-0.25339	0.13382
PKA 0h + GO 6850	-0.22680	0.07158	0.02213	0.20249	0.13020	0.0678	0.06367	0.10131	0.06367	0.10131
PKA 0h + GO 6976	0.32303	0.27408	0.00095	0.22048	-0.09107	0.0814	-0.06391	0.14721	-0.06391	0.14721
PKA 1h	-0.32407	0.27408	0.00000	0.71385	0.11273	0.13346	0.07405	0.20645	0.07405	0.20645
PKA 1h + GO 6850	-0.32497	0.19710	0.00000	0.00000	-1.36102	0.05670	-0.69701	0.25577	-0.69701	0.25577
PKA 1h + GO 6976	-0.35857	0.07334	0.00000	0.05588	-1.34862	0.20412	-0.96557	0.02583	-0.96557	0.02583
PKA 1h + PKC 412	-0.31383	0.04043	0.00000	0.39273	-1.46822	0.16174	-0.92549	0.1788	-0.92549	0.1788
PKA 1h + PKC 412	-1.50988	0.19101	0.00000	0.00433	-1.75555	0.09140	-1.47136	0.20168	-1.47136	0.20168
PKA 1h + PKC 412	0.15397	0.05366	0.00002	0.00000	0.79193	0.12087	0.17185	0.13439	0.17185	0.13439
PKA 1h + PKC 412	0.08244	0.07318	0.00000	0.00000	-0.25914	0.06486	-0.25919	0.28786	-0.25919	0.28786
PKA 1h + PKC 412	-1.00493	0.07318	0.00000	0.00000	-0.85626	0.05840	-0.85626	0.05840	-0.85626	0.05840
PKA 1h + PKC 412	-0.41010	0.40516	0.0432	0.00677	-1.16042	0.28886	-0.90470	0.30449	-0.90470	0.30449
PKA 1h + PKC 412	-1.86297	0.52721	0.00000	0.01156	-2.35191	0.13259	-1.25986	0.16104	-1.25986	0.16104
PKA 1h + PKC 412	-1.38951	0.13314	0.00000	0.00751	-2.85511	0.16386	-1.35961	0.10216	-1.35961	0.10216
PKA 1h + PKC 412	-2.28088	0.04948	0.00000	0.00000	-2.21357	0.02810	-2.22212	0.10015	-2.22212	0.10015
PKA 1h + PKC 412	-2.89243	0.43960	0.00000	0.00000	-2.95885	0.43332	-2.83044	0.27235	-2.83044	0.27235
PKA 1h + PKC 412	-0.70730	0.03495	0.95016	0.00000	-1.27272	0.0432	0.00000	0.10896	0.00000	0.10896
PKA 1h + PKC 412	-0.28689	0.10939	0.00502	0.00000	-1.35874	0.08759	0.47866	0.07287	0.47866	0.07287
PKA 1h + PKC 412	0.08353	0.17214	0.36868	0.00000	0.00447	0.13344	-0.46016	0.36010	-0.46016	0.36010
PKA 1h + PKC 412	0.03328	0.07959	0.00000	0.00000	0.92486	0.17830	0.53108	0.05667	0.53108	0.05667
PKA 1h + PKC 412	0.05699	0.11160	0.00000	0.79410	0.88549	0.10897	0.88549	0.10897	0.88549	0.10897
PKA 1h + PKC 412	0.05593	0.08948	0.00000	0.00000	0.73131	0.08893	0.35527	0.15696	0.35527	0.15696
PKA 1h + PKC 412	0.52340	0.02467	0.00000	0.00000	0.99852	0.05440	0.99852	0.05440	0.99852	0.05440
PKA 1h + PKC 412	0.19574	0.07469	0.00001	0.00000	0.66965	0.07300	0.66965	0.07300	0.66965	0.07300
PKA 1h + PKC 412	0.06510	0.13446	0.55551	0.00000	0.14218	0.15336	0.47719	0.22093	0.47719	0.22093
PKA 1h + PKC 412	-0.60623	0.21472	0.00005	0.00000	-0.53032	0.12133	-0.46916	0.16103	-0.46916	0.16103
PKA 1h + PKC 412	-0.25266	0.07193	0.01914	0.00000	-0.26536	0.10862	-0.26536	0.10862	-0.26536	0.10862
PKA 1h + PKC 412	-0.19983	0.04864	0.8832	0.00000	-0.11754	0.04720	-0.11754	0.04720	-0.11754	0.04720
PKA 1h + PKC 412	0.19320	0.13552	0.00215	0.00000	0.27095	0.13381	0.27095	0.13381	0.27095	0.13381

Kendall's tau-P	PKPCA		PKCCO		PKNC2		PKNC1		PKNC0	
	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert
WHL-P 0h	0.00327	0.1518	0.00465	0.1705	0.00436	0.1739	0.00458	0.1739	0.00436	0.1739
WHL-P 0h + GO 6850	-0.46791	0.8527	0.1052	0.3902	-0.83070	0.2406	-0.16179	0.2728	-0.16179	0.2728
WHL-P 0h + GO 6976	-0.28070	0.7040	0.00535	0.3586	-0.35827	0.0953	-0.25394	0.14197	-0.25394	0.14197
WHL-P 1h	-0.80967	0.0760	0.00000	0.28136	-0.42465	0.0862	-0.31958	0.2037	-0.31958	0.2037
WHL-P 1h + GO 6850	-0.64173	0.1138	0.00000	0.10081	-1.13091	0.1269	-0.93863	0.1446	-0.93863	0.1446
WHL-P 1h + GO 6976	-0.96044	0.2125	0.00000	0.28824	-1.05956	0.0847	-0.92218	0.1208	-0.92218	0.1208
PKA 0h	-0.45729	0.09575	0.00015	0.3586	-0.85913	0.0943	-0.25339	0.13382	-0.25339	0.13382
PKA 0h + GO 6850	-0.22680	0.07158	0.02213	0.20249	0.13020	0.0678	0.06367	0.10131	0.06367	0.10131
PKA 0h + GO 6976	0.32303	0.27408	0.00095	0.22048	-0.09107	0.0814	-0.06391	0.14721	-0.06391	0.14721
PKA 1h	-0.32407	0.27408	0.00000	0.71385	0.11273	0.13346	0.07405	0.20645	0.07405	0.20645
PKA 1h + GO 6850	-0.32497	0.19710	0.00000	0.00000	-1.36102	0.05670	-0.69701	0.25577	-0.69701	0.25577
PKA 1h + GO 6976	-0.35857	0.07334	0.00000	0.05588	-1.34862	0.20412	-0.96557	0.02583	-0.96557	0.02583
PKA 1h + PKC 412	-0.31383	0.04043	0.00000	0.39273	-1.46822	0.16174	-0.92549	0.1788	-0.92549	0.1788
PKA 1h + PKC 412	-1.50988	0.19101	0.00000	0.00433	-1.75555	0.09140	-1.47136	0.20168	-1.47136	0.20168
PKA 1h + PKC 412	0.15397	0.05366	0.00002	0.00000	0.79193	0.12087	0.17185	0.13439	0.17185	0.13439
PKA 1h + PKC 412	0.08244	0.07318	0.00000	0.00000	-0.25914	0.06486	-0.25919	0.28786	-0.25919	0.28786
PKA 1h + PKC 412	-1.00493	0.07318	0.00000	0.00000	-0.85626	0.05840	-0.85626	0.05840	-0.85626	0.05840
PKA 1h + PKC 412	-0.41010	0.40516	0.0432	0.00677	-1.16042	0.28886	-0.90470	0.30449	-0.90470	0.30449
PKA 1h + PKC 412	-1.86297	0.52721	0.00000	0.01156	-2.35191	0.13259	-1.25986	0.16104	-1.25986	0.16104
PKA 1h + PKC 412	-1.38951	0.13314	0.00000	0.00751	-2.85511	0.16386	-1.35961	0.10216	-1.35961	0.10216
PKA 1h + PKC 412	-2.28088	0.04948	0.00000	0.00000	-2.21357	0.02810	-2.22212	0.10015	-2.22212	0.10015
PKA 1h + PKC 412	-2.89243	0.43960	0.00000	0.00000	-2.95885	0.43332	-2.83044	0.27235	-2.83044	0.27235
PKA 1h + PKC 412	-0.70730	0.03495	0.95016	0.00000	-1.27272	0.0432	0.00000	0.10896	0.00000	0.10896
PKA 1h + PKC 412	-0.28689	0.10939	0.00502	0.00000	-1.35874	0.08759	0.47866	0.07287	0.47866	0.07287
PKA 1h + PKC 412	0.08353	0.17214	0.36868	0.00000	0.00447	0.13344	-0.46016	0.36010	-0.46016	0.36010
PKA 1h + PKC 412	0.03328	0.07959	0.00000	0.00000	0.92486	0.17830	0.53108	0.05667	0.53108	0.05667
PKA 1h + PKC 412	0.05699	0.11160	0.00000	0.79410	0.88549	0.10897	0.88549	0.10897	0.88549	0.10897
PKA 1h + PKC 412	0.05593	0.08948	0.00000	0.00000	0.73131	0.08893	0.35527	0.15696	0.35527	0.15696
PKA 1h + PKC 412	0.52340	0.02467	0.00000	0.00000	0.99852	0.05440	0.99852	0.05440	0.99852	0.05440
PKA 1h + PKC 412	0.19574	0.07469	0.00001	0.00000	0.66965	0.07300	0.66965	0.07300	0.66965	0.07300
PKA 1h + PKC 412	0.06510	0.13446	0.55551	0.00000	0.14218	0.15336	0.47719	0.22093	0.47719	0.22093
PKA 1h + PKC 412	-0.60623	0.21472	0.00005	0.00000	-0.53032	0.12133	-0.46916	0.16103	-0.46916	0.16103
PKA 1h + PKC 412	-0.25266	0.07193	0.01914	0.00000	-0.26536	0.10862	-0.26536	0.10862	-0.26536	0.10862
PKA 1h + PKC 412	-0.19983	0.04864	0.8832	0.00000	-0.11754	0.04720	-0.11754	0.04720	-0.11754	0.04720
PKA 1h + PKC 412	0.19320	0.13552	0.00215	0.00000	0.27095	0.13381	0.27095	0.13381	0.27095	0.13381

Kendall's tau-P	PKPCA		PKCCO		PKNC2		PKNC1		PKNC0	
	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert	Std. Abw.	# P-Wert
WHL-P 0h	0.00327	0.1518	0.00465	0.1705	0.00436	0.1739	0.00458	0.1739	0.00436	0.1739
WHL-P 0h + GO 6850	-0.46791	0.8527	0.1052	0.3902	-0.83070	0.2406	-0.16179	0.2728	-0.16179	0.2728
WHL-P 0h + GO 6976	-0.28070	0.7040	0.00535	0.3586	-0.35827	0.0953	-0.25394	0.14197	-0.25394	0.14197
WHL-P 1h	-0.80967	0.0760	0.00000	0.28136	-0.42465	0.0862	-0.31958	0.2037	-0.31958	0.2037
WHL-P 1h + GO 6850	-0.64173	0.1138	0.00000	0.10081	-1.13091	0.1269	-0.93863	0.1446	-0.93863	0.1446
WHL-P 1h + GO 6976	-0.96044	0.2125	0.00000	0.28824	-1.05956	0.0847	-0.92218	0.1208	-0.92218	0.1208
PKA 0h	-0.45729	0.09575	0.00015	0.3586	-0.85913	0.0943	-0.25339	0.13382	-0.25339	0.13382
PKA 0h + GO 6850	-0.22680	0.07158	0.02213	0.20249	0.13020	0.0678	0.06367	0.10131	0.06367	0.10131
PKA 0h + GO 6976	0.32303	0.27408	0.00095	0.22048	-0.09107	0.0814	-0.06391	0.14721	-0.06391	0.14721
PKA 1h	-0.32407	0.27408	0.00000	0.71385	0.11273	0.13346	0.07405	0.20645	0.07405	0.20645
PKA 1h + GO 6850	-0.32497	0.19710	0.00000	0.00000	-1.36102	0.05670	-0.69701	0.25577	-0.69701	0.25577
PKA 1h + GO 6976	-0.35857	0.07334	0.00000	0.05588	-1.34862	0.20412	-0.96557	0.02583	-0.96557	0.02583
PKA 1h + PKC 412	-0.31383	0.04043	0.00000	0.39273	-1.46822	0.16174	-0.92549	0.1788	-0.92549	0.1788
PKA 1h + PKC 412	-1.50988	0.19101	0.00000	0.00433	-1.75555	0.09140	-1.47136	0.20168	-1.47136	0.20168
PKA 1h + PKC 412	0.15397	0.05366	0.00002	0.00000	0.79193	0.12087	0.17185	0.13439	0.17185	0.13439
PKA 1h + PKC 412	0.08244	0.07318	0.00000	0.00000						

	ASAT		Std. Abw.	P-Wert *	P-Wert #	ALAT		LDH	Std. Abw.	P-Wert *	P-Wert #	g-GT		Std. Abw.	Laktat	Std. Abw.	P-Wert *	P-Wert #
	Mittelwert					Mittelwert	Std. Abw.					Mittelwert			Mittelwert			
Kontrolle	0,129		0,019				0,10	0,00	0,366	0,121			0,07		0	1,296	0,139	
Cytokinmix	0,440		0,109	0,00000			0,18	0,04	0,899	0,182	0,00000		0,07		0	1,760	0,314	0,00008
CM + GÖ 6850	0,430		0,066	0,00000			0,20	0,05	0,591	0,238	0,03240		0,07		0	1,806	0,169	0,00000
CM + GÖ 6976	0,414		0,071	0,00000			0,20	0,06	0,614	0,194	0,00703		0,07		0	1,714	0,198	0,00001
CM + AS605240	0,507		0,106	0,00000			0,24	0,08	0,624	0,203	0,00636		0,07		0	1,964	0,063	0,00000
CM + PKC412	0,451		0,055	0,00000			0,23	0,07	0,602	0,194	0,00523		0,07		0	1,766	0,098	0,00000
AS605240	0,151		0,023	0,02498			0,10	0,00	0,491	0,309	0,24503		0,07		0	1,439	0,099	0,02062
PKC412	0,129		0,034	1,00000			0,10	0,00	0,311	0,196	0,24790		0,07		0	1,289	0,129	0,91333
GÖ 6850	0,130		0,011	0,87269			0,10	0,00	0,274	0,119	0,07468		0,07		0	1,309	0,087	0,95532
GÖ 6976	0,134		0,019	0,56875			0,10	0,00	0,322	0,167	0,26095		0,07		0	1,307	0,165	0,68534
LPS	0,147		0,021	0,02513			0,10	0,00	0,349	0,203	0,71142		0,07		0	1,433	0,097	0,01585
TNF-alpha	0,186		0,040	0,00016			0,10	0,01	0,319	0,146	0,37695		0,07		0	1,318	0,070	0,53017
IFN-gamma	0,136		0,037	0,35416			0,10	0,00	0,272	0,121	0,11105		0,07		0	1,299	0,071	0,81138
IL 1-beta	0,164		0,038	0,00875			0,10	0,00	0,344	0,104	0,47101		0,07		0	1,508	0,061	0,00095
IL 6	0,159		0,046	0,04288			0,10	0,00	0,363	0,124	0,82361		0,07		0	1,593	0,094	0,00003
PMA	0,238		0,043	0,00000			0,11	0,01	0,718	0,118	0,00032		0,07		0	1,645	0,153	0,00056
PMA + GÖ 6850	0,130		0,016	0,91082	0,0064		0,10	0,00	0,455	0,050	0,20207	0,01222	0,07		0	1,573	0,075	0,00180
PMA + GÖ 6976	0,178		0,004	0,00016	0,0516		0,10	0,00	0,588	0,029	0,00442	0,11402	0,07		0	1,685	0,094	0,00008
PMA + PKC412	0,140		0,013	0,17542	0,0001		0,10	0,00	0,319	0,167	0,64781	0,00221	0,07		0	1,384	0,184	0,21016
Byo 1	0,290		0,091	0,00001			0,12	0,03	0,795	0,150	0,00010		0,07		0	1,740	0,093	0,00002
Byostatin 1 + GÖ 6850	0,113		0,005	0,21101	0,0357		0,10	0,00	0,447	0,012	0,30238	0,01941	0,07		0	1,430	0,073	0,13991
Byostatin 1 + GÖ 6976	0,120		0,014	0,48904	0,0416		0,10	0,00	0,447	0,053	0,31266	0,02266	0,07		0	1,450	0,070	0,09256
NMILP	0,145		0,015	0,29563			0,10	0,00	0,480	0,070	0,25316		0,07		0	1,565	0,105	0,02357
NMILP + GÖ6850	0,115		0,015	0,37384	0,2929		0,10	0,00	0,425	0,015	0,53526	0,52264	0,07		0	1,370	0,180	0,52491
NMILP + GÖ6976	0,115		0,005	0,35883	0,1982		0,10	0,00	0,425	0,055	0,54149	0,59967	0,07		0	1,330	0,200	0,77218
Serum sept. Pat.	0,690		0,170	0,00000			0,19	0,06	0,953	0,141	0,00001		0,105		0,005	1,807	0,127	0,00177

**Werte aus der Klinischen Chemie.** Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung sowie p-Werte.

rel IntDen MRP2	Anzahl Werte	Mittelwert	Standardfehler	* P-Wert	# P-Wert
Kontrolle	38	100,00000	5,62573		
PMA	20	43,66075	5,45787	0,00000	
PMA + GÖ6850	14	52,05985	7,83974	0,00001	0,29332
PMA + GÖ6976	19	32,15300	4,39112	0,00000	0,10510
PMA + PKC412	16	87,71494	10,92884	0,21543	0,00001
Bryostatin1	14	75,18538	11,74946	0,02326	
Bryostatin1 + GÖ6850	16	62,47062	7,95677	0,00019	0,20131
Bryostatin1 + GÖ6976	19	47,98127	5,23147	0,00000	0,00541
NfMLP	17	59,49706	6,32500	0,00003	
NfMLP + GÖ 6850	17	52,77517	7,03006	0,00000	0,45966
NfMLP + GÖ 6976	17	52,36852	7,03566	0,00000	0,42901
NfMLP + AS605240	12	32,62366	6,40796	0,00000	0,00124
Cytokinmix	18	18,97719	2,06159	0,00000	
CM + GÖ6850	20	16,91087	0,85635	0,00000	0,25407
CM + GÖ6976	20	18,22410	1,35129	0,00000	0,72155
CM + AS650240	19	19,75625	1,40384	0,00000	0,71781
CM + PKC412	20	16,69919	1,58116	0,00000	0,32203
LPS	18	63,78860	5,75888	0,00009	
TNF- $\alpha$	20	65,94208	6,61610	0,00027	
IFN- $\gamma$	15	95,30829	11,71220	0,62362	
IL-1 $\alpha$	14	90,26987	11,69222	0,32457	
IL-6	13	65,18843	9,14763	0,00145	
Serum sept. Pat.	16	68,03250	1,83223	0,00064	
GÖ6850	16	100,45631	3,76978	0,07597	
GÖ6976	16	82,70237	10,11554	0,05343	
AS650240	16	79,17085	5,87193	0,00008	
PKC412	14	55,91785	8,58218	0,33325	

**Werte aus der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung.** Mittelwerte mit Standardfehler und p-Werten.

PKC alpha		Mittelwert	Std. Abw.	P-Wert *	P-Wert #
Membran	Kontrolle	0,8324	0,8696	1,0000	
6	PMA	3,4356	5,4292	0,3207	
16	PMA	7,5199	6,0580	0,0403	0,2941
6	Bryo1	1,0795	0,3803	0,5764	
16	Bryo1	0,3556	0,2149	0,2681	0,0060
6	Nfmlp	4,5071	2,9954	0,0300	
16	NFmlp	6,5159	3,8073	0,0116	0,3809
6	Cytokinmix	7,4783	4,7227	0,0148	
16	Cytokinmix	4,3777	3,1238	0,0403	0,2556
Cytosol	Kontrolle	7,6912	2,3783	1,0000	
6	PMA	0,6807	0,8513	0,0014	
16	PMA	0,3593	0,4135	0,0009	0,5223
6	Bryo1	0,0000	0,0000	0,0006	
16	Bryo1	0,1823	0,3647	0,0008	0,3559
6	Nfmlp	5,8351	4,1111	0,4642	
16	NFmlp	8,7072	5,3090	0,7388	0,4251
6	Cytokinmix	12,4539	4,3371	0,1024	
16	Cytokinmix	10,0031	1,9075	0,1802	0,3408
PKC zeta		Mittelwert	Std. Abw.	P-Wert *	P-Wert #
Membran	Kontrolle	0,5258	0,5111	1,0000	
6	PMA	2,8595	1,9758	0,0622	
16	PMA	2,5181	1,6515	0,0607	0,7998
6	Bryo1	2,7753	1,5352	0,0320	
16	Bryo1	1,4310	0,6298	0,0671	0,1563
6	Nfmlp	2,2764	1,0807	0,0263	
16	NFmlp	2,1984	1,4748	0,0758	0,9348
6	Cytokinmix	9,0773	2,5239	0,0006	
16	Cytokinmix	3,4410	1,3765	0,0074	0,0078
Cytosol	Kontrolle	6,3474	2,4703	1,0000	
6	PMA	5,2380	0,6199	0,4172	
16	PMA	9,8829	1,5879	0,0527	0,0016
6	Bryo1	6,2910	3,9106	0,9813	
16	Bryo1	3,6978	1,6632	0,1255	0,2681
6	Nfmlp	4,2115	1,9100	0,2203	
16	NFmlp	7,5070	5,3948	0,7094	0,2933
6	Cytokinmix	7,6356	4,0087	0,6040	
16	Cytokinmix	7,7305	4,8117	0,6273	0,9768

#### Auswertung der Optische Dichte der Banden (Membranfraktionierung)